

**DIE QUALITATIVE UND QUANTITATIVE
BESTIMMUNG VON NICHTFLÜCHTIGEN
BIOGENEN AMINEN IN
ARZNEILICH VERWENDETEN DROGEN**

Eberhard Römhild

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554614_0043

DIE QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BESTIMMUNG

VON NICHTFLÜCHTIGEN BIOGENEN AMINEN

IN ARZNEILICH VERWENDETEN DROGEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München



vorgelegt

von

Eberhard Römhild

aus

Diessen/Ammersee

November

1976

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner
2. Berichterstatter: Professor Dr. Th. Severin
Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1976



Das Thema dieser Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. H. Wagner
vorgeschlagen, dem ich für wissenschaftliche Anregungen und
Ratschläge sehr herzlich danke.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>ALLGEMEINER TEIL</u>	2
1.0. <u>Die biogenen Amine</u>	2
1.1. Geschichtlicher Überblick	2
1.2. Biosynthese und Vorkommen der Amine	3
1.2.1. Aethanolamin	5
1.2.2. Putrescin	6
1.2.3. Cadaverin	6
1.2.4. Tryptamin und 5-Hydroxytryptamin	7
1.2.5. Histamin	8
1.2.6. Noradrenalin	8
1.2.7. Tyramin	8
1.2.8. Dopamin	9
1.3. Pharmakologische Eigenschaften der Amine	11
1.3.1. Histamin	11
1.3.2. Serotonin	12
1.3.3. Noradrenalin	13
1.3.4. Tyramin	13
1.3.5. Dopamin	14

	Seite
1.4. Bisherige analytische Methoden	16
1.4.1. Photometrie	16
1.4.2. Fluorometrie	17
1.4.3. Gaschromatographie	18
1.4.4. Elektrophorese	19
1.4.5. Trennmethoden	20
2.0. <u>Screening der Drogen</u>	22
2.1. Abtrennen der Amine mit dem Ionenaustauscher . .	22
2.2. Dünnschichtchromatographie	23
2.2.1. Fixieren der Ninhydrinflecken	23
2.2.2. DC-Charakteristika einiger biogener Amine	24
2.2.3. Auswertung der Chromatogramme	26
2.2.4. DC-Charakteristika einiger Aminosäuren .	27
2.2.5. Diskussion der Ergebnisse	29
2.2.6. Zum speziellen Nachweis von Aethanolamin	30
2.2.7. Übersichtstabelle zum Screening der Drogen	31
3.0. <u>Bestimmung von Aminen mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol</u> . .	34
3.1. Zur Reaktionsfähigkeit des DNFB	34
3.2. Herstellung der Testsubstanzen	37
3.3. Die Strukturen der Dinitrophenylamine	41
3.3.1. Ergebnisse der NMR-Spektren	41
3.4. IR-Überlagerungsspektren	52
3.5. Absorptionsspektren der DNP-Amine	54
3.6. Aufstellung der Eichgeraden	56

	Seite
3.7. Dünnschichtchromatographische Trennung der DNP-Amine	59
3.8. Umsetzung kleiner Aminmengen mit DNFB	67
3.8.1. Reagenzien	67
3.8.2. Durchführung der Reaktion	68
3.8.3. Quantitative Bestimmung	70
3.9. Berechnung des Amingehaltes	71
3.10. Beleganalysen zur quantitativen Bestimmung	72
3.10.1. Diskussion der Ergebnisse	73
3.10.2. Zur Frage der irreversiblen Adsorption an Kieselgel	75
4.0. <u>Bestimmungen aus dem Pflanzenmaterial</u>	76
4.1. Extraktion der biogenen Amine	76
4.2. Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol	78
4.3. DC-Auftrennung und Spektralphotometrie	79
4.4. Fällung störender Ballaststoffe mit Aceton	80
4.5. Abtrennen der flüchtigen Amine	81
4.6. Extraktionsschema zur Anreicherung von Aminen	83
4.7. Beleganalysen zur Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode	84
4.7.1. Bestimmung von Aminen in einer Modell- mischung	84
4.7.2. Zusatz von Aminen zu einem aminfreien Pflanzenextrakt	85
4.7.3. Zusatz von Tyramin zu einem aminhaltigen Extrakt	88

	Seite
4.8. Untersuchungen an Drogen	89
4.8.1. Übersichtstabelle	90
4.8.2. Diskussion der Ergebnisse	92
 <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u>	 94
5.0. <u>Arbeitsvorschrift zur Extraktion der Amine</u>	94
5.1. Screening	94
5.2. Quantitative Bestimmung der Amine	95
6.0. <u>Allgemeine Arbeitsmethoden</u>	100
6.1. Herkunft der Drogen	100
6.2. Dünnschichtchromatographie	100
6.3. Säulenchromatographie	103
6.4. Physikalische Untersuchungen	104
7.0. <u>Spezielle Arbeitsmethoden</u>	106
7.1. Screening der Drogen	106
7.2. Herstellen der Testsubstanzen	108
7.3. Die Eichgeraden der DNP-Amine, Messwerte und Fehlerrechnung	110
7.4. Dünnschichtchromatographie der DNP-Amine	120
7.5. Umsetzung kleiner Aminmengen mit DNFB	121
7.6. Bestimmungen aus dem Pflanzenmaterial	132
 LITERATURVERZEICHNIS	 136

Unter biogenen Aminen versteht man niedermolekulare, stickstoffhaltige Basen, die im Verlauf von Stoffwechselreaktionen im pflanzlichen, tierischen und menschlichen Organismus entstehen. In den höheren Pflanzen treten biogene Amine als Vorstufen von Alkaloiden auf, weshalb für sie die Bezeichnung Protoalkaloide vorgeschlagen wurde^{1) 2)}.

In den letzten Jahren konzentrierte sich das wissenschaftliche Interesse besonders auf die pharmakologisch und physiologisch bedeutsamen Catecholamine wie Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und auf Serotonin, Tyramin und Histamin, während die einfachen β -Phenylaethylamine sowie die aliphatischen Mono- und Diamine noch wenig Beachtung fanden.

Alle genannten Amine kommen auch in Pflanzen vor. Über ihre Verbreitung gibt es aber nur ein recht lückenhaftes Wissen. Der Grund liegt darin, daß sie als Pflanzeninhaltsstoffe bisher weniger interessant erschienen, aber auch weil ihre Isolierung und Identifizierung methodisch schwierig war.

Für die Phytotherapie kann die Existenz der Amine in zweierlei Weise von Bedeutung sein. Einmal darf man annehmen, daß manche Drogen ihre volkstümliche Anwendung diesen Verbindungen ganz oder teilweise verdanken. Zum anderen können die gleichen Amine, da sie meistens schon in geringen Mengen pharmakologisch wirksam werden, Anlaß zu unerwünschten Nebenwirkungen geben. Dies muß besonders bei Dauergebrauch von Tees oder Drogenextrakten befürchtet werden.

Im Hinblick auf die "Arzneimittelsicherheit" ist daher die Frage von Interesse, ob und unter welchen Bedingungen der Genuß solcher Drogen oder ihrer Zubereitungen als bedenklich eingestuft werden muß.

Nachdem es vor einigen Jahren gelungen war, die flüchtigen Amine durch Wasserdampfdistillation abzutrennen und zu bestimmen, sollte es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, eine Methode auszuarbeiten, mit der die nicht-flüchtigen Amine aus Pflanzen isoliert und quantitativ bestimmt werden können.

ALLGEMEINER TEIL

1.0. Die biogenen Amine

1.1. Geschichtlicher Überblick

Die biogenen Amine sind größtenteils um die Jahrhundertwende, in den Jahren 1880 bis 1910 gefunden worden, etwa einhundert Jahre nach der Entdeckung der bekanntesten Alkaloide.

Durch forensisch medizinische Untersuchungen wurden Hinweise auf die Entstehung alkaloidartiger Leichengifte erhalten, die ähnliche Reaktionen zeigten wie die zu verbrecherischen Zwecken verwendeten Pflanzenbasen Coniin, Nicotin und Atropin¹⁾.

Diese stickstoffhaltigen, basischen Verbindungen, die bei der Eiweißfäulnis oder bei der Verwesung von Organismen entstehen, wurden "Ptomaine" genannt. Versuche, sie mit den für Alkaloide geeigneten Isolierungsmethoden von Stas-Otto und Dragendorff²⁾ aus den Fäulnisprodukten abzutrennen, führten nicht zu einheitlichen Substanzen.

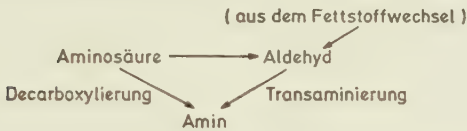
Gautier und Brieger^{3) 4) 5)} waren 1882 und 1885 die ersten, die Amine aus Fäulnisprodukten gewinnen konnten, und zwar als Gold- und Platinsalze. Sie isolierten und fraktionierten die Basen mit Mercurichlorid und trennten sie aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der Chloraurate und Chlorplatinate.

1910 wurden in dem Mutterkorn das sympathomimetisch wirksame Tyramin und das Histamin entdeckt. Seither ist eine große Zahl von Aminen in Pflanzen identifiziert worden. Ihre Bildungsweise ist heute bekannt.

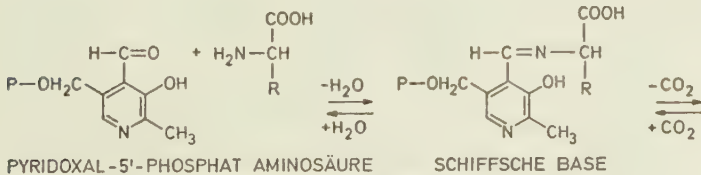
1.2. Biosynthese und Vorkommen der Amine

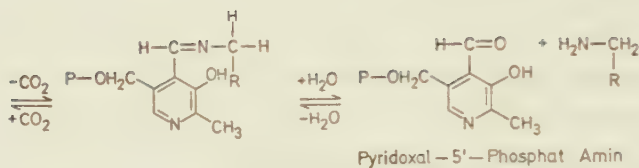
Amine entstehen in Pflanzen hauptsächlich auf zwei verschiedenen Biosynthesewegen:

1. Durch Decarboxylierung der Aminosäuren
2. Durch Übertragung von Ammoniak von Aminosäuren auf Aldehyde (Transaminierung)⁶⁾.

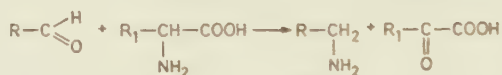


Die enzymatische Decarboxylierung der Aminosäuren erfolgt durch Aminosäuredecarboxylasen, die auch in Mikroorganismen vorkommen. Sie enthalten als Coenzym das Pyridoxal-5-phosphat. Man nimmt an, daß sich zwischen der Aldehydgruppe des Pyridoxalphosphats und der Aminogruppe der Säure zunächst eine Schiff'sche Base bildet, die dann decarboxyliert und in das Amin und Pyridoxal-5-phosphat zerlegt wird⁶⁾.





Die Übertragung des Ammoniaks von Aminosäuren auf Aldehyde wird wahrscheinlich durch Aminosäure-Aldehyd-Transaminasen nach folgendem Schema katalysiert:



Hartmann und Mitarb.⁷⁾ berichteten über ein Transaminasesystem, das die reversible Umaminierung zwischen aliphatischen Aminosäuren und Monoaldehyden katalysiert. In Versuchen mit *Mercurialis perennis* bewiesen sie beispielsweise die Bildung von Äthylamin, i-Butylamin, i-Amylamin und n-Hexylamin unter Katalyse dieses Enzymsystems. Dagegen verliefen Versuche, die Entstehung der in *Mercurialis* vorkommenden Monoamine durch Decarboxylierung entsprechender Aminosäuren nachzuweisen, ergebnislos. In einer weiteren Arbeit untersuchten Hartmann und Ilert²¹⁾ 52 Blütenpflanzen aus verschiedenen Familien auf die Fähigkeit zur Biosynthese flüchtiger Amine. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß der

bevorzugte Syntheseweg zur Bildung aliphatischer Monoamine die Aldehydaminierung ist. Die geradkettigen Aldehyde stammen wahrscheinlich aus dem Fettsäurenabbau⁸⁾. Sie werden über α -Oxydation oder oxydativen Abbau der ungesättigten Fettsäuren synthetisiert. N-Hexanal entsteht beispielsweise aus Linolensäure⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾.

Die verzweigtkettigen Aldehyde, wie i-Butanal und i-Pentanal, die als Vorstufen von i-Butyl- und i-Amylamin in Frage kommen, werden offensichtlich aus den entsprechenden Aminosäuren durch Desaminierung und nicht-oxydative Decarboxylierung synthetisiert¹²⁾.

Im Gegensatz zu den primären aliphatischen Monoaminen werden die höheren Amine, auf die sich unsere Untersuchungen beziehen, durch Aminosäuredecarboxylierung enzymatisch gebildet. Nach Hartmann⁷⁾ handelt es sich um die Hauptfunktion des Enzyms, während bei der Transaminierung die Amine nur als Nebenprodukte entstehen.

Von den in Pflanzen vorkommenden Aminen interessierten für unsere Untersuchungen folgende:

1.2.1. Aethanolamin

Aethanolamin kommt als Baustein von Phosphatiden der Kephalin-Fraktion in der Natur vor. Seine N-Methylderivate sind Zwischenprodukte der Cholinbiosynthese. Bis jetzt ist es in freier Form nur selten beobachtet worden¹³⁾, unter anderem in Crataegus¹⁴⁾, in Secale¹⁵⁾, in Bananen (Musa sapientium)¹³⁾, in Sauerkraut¹⁶⁾ und in Citrus-Blättern und Früchten¹⁷⁾. Es entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure Serin⁶⁾ oder durch Aldehydaminierung aus Glykolaldehyd, das wiederum aus zwei Molekülen Formaldehyd gebildet wird²⁾.

1.2.2. Putrescin

Putrescin (Tetramethylendiamin) wurde 1885 von Brieger aus verfauten tierischen Organen isoliert.

Putrescin konnte nachgewiesen werden in *Secale*¹⁸⁾, im Fliegenpilz (*Amanita muscaria*)¹⁹⁾ und Steinpilz (*Boletus aereus*)²⁰⁾.

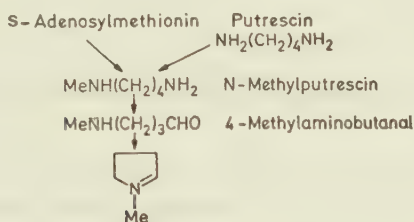
In den höheren Pflanzen findet sich das Amin unter den Nebenalkaloiden von *Datura stramonium* und *Atropa belladonna*²⁾, in *Nicotiana tabacum*, *Sesamum indicum*²²⁾ und in *Hyoscyamus muticus*²⁰⁾ sowie in den Früchten von Bananen¹³⁾, Orangen (*Citrus aurant. var. dulcis*)²³⁾, *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Glycine soja*²⁴⁾ und in verschiedenen Apfelsorten. Putrescin entsteht in der keimenden Gerste aus Arginin über Agmatin und N-Carbamylputrescin²⁴⁾.

1.2.3. Cadaverin

Cadaverin (Pentamethylendiamin) findet sich meist vergesellschaftet mit Putrescin. Deshalb ist es auch in allen unter Putrescin aufgeführten Pflanzen zu finden. Darüber hinaus ist es im Mauerpfeffer (*Sedum acre*) enthalten, wo es wahrscheinlich in das Alkaloid Sedamin mit eingebaut wird.

Das Diamin entsteht wahrscheinlich aus der Aminosäure Lysin über Homoarginin und Homoagmatin. Dieser Syntheseweg konnte in der Kichererbse (*Lathyrus sativus*) nachgewiesen werden²⁴⁾. Mizusaki und Mitarb.²⁴⁾ fanden in den Tabakblättern ein Enzym (N-Methylputrescin-Oxydase MPO), das die Fähigkeit besitzt, die primären Aminogruppen des Putrescins zu oxydieren. Das Oxydationsprodukt von N-Methylputrescin, 4-Methylaminobutanal, lagert sich spontan unter Ringbildung zum N-Methylpyrrolin um und wird wahrscheinlich in das Nicotinmolekül eingebaut. Dies scheint auch ein Beweis für die These zu sein, daß manche Amine als direkte Vorstufen

von Alkaloiden fungieren können. Nachstehend die Abbildung der Synthese von N-Methylpyrrolin:



1.2.4. Tryptamin und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

Beide Amine finden sich in der Gerste und in Tomatenkeimlingen²⁴⁾.

Tryptamin kommt in verschiedenen Acacia-Arten vor: *Acacia floribunda*, *A. pruriosa*, *A. longifolia*²⁵⁾.

Serotonin, früher wegen seiner pharmakologischen Wirkung auch Vasoconstrictin genannt, ist in besonders großen Mengen in Bananen und Walnüssen (*Juglans regia*)²⁶⁾ enthalten, außerdem in *Pisum sativum*, *Passiflora quadrangularis*, Avocados und roten Pflaumen^{24) 2)}. Beide Amine entstehen aus dem Tryptophan durch Decarboxylierung. In den Samen von *Piptadenia peregrina* (Leguminosae), die von amerikanischen Indianern zur Herstellung eines berauschenden Schnupftabaks verwendet werden, wird Tryptamin direkt zu Serotonin hydroxyliert. Es wird vermutet, daß daraus über N-Methyl-tryptamin das halluzinogene Bufotenin entsteht²⁷⁾,

das auch im Hautsekret von *Bufo communis* und verschiedenen anderen Krötenarten vorkommt.

1.2.5. Histamin

Histamin wurde zuerst von Barger und Dale im Mutterkornextrakt entdeckt²⁾.

Es ist bisher in Brennesselhaaren, Spinat, in *Gossypium*-Arten (Baumwolle)²⁸⁾, in Sauerkraut¹⁶⁾ und in verschiedenen Weinen nachgewiesen worden.

In den Pflanzen entsteht Histamin aus Histidin²⁾.

1.2.6. Noradrenalin

Noradrenalin ist in Knospentrieben von *Aconitum napellus*²⁹⁾, in Bananenschalen³⁰⁾, in Kartoffeln³¹⁾, in *Mimosa pudica*²⁴⁾ und in den Früchten von *Musa sapientum* var. *paradisica* (Matoke Banane)³²⁾ gefunden worden.

Über die Biosynthese des Noradrenalins in Pflanzen gibt es noch keine gesicherten Vorstellungen. Möglicherweise entsteht es wie im tierischen Organismus aus dem Dopamin durch Hydroxylierung²⁴⁾.

1.2.7. Tyramin

Tyramin wurde 1885 aus verfaulten menschlichen Eingeweiden isoliert und als "Mydin" bezeichnet. In Pflanzen ist es verbreitet zu finden, in verschiedenen Arten der amerikanischen Mistel *Phoradendron*³³⁾, in der europäischen Mistel³⁴⁾, dem Samen der Mariendistel (*Silybum marianum*)³⁵⁾, in

*Genista tinctoria*³⁶⁾, in argentinischen Mistelarten³⁷⁾, in *Prosopis alba*³⁸⁾, in *Aconitum napellus*²⁹⁾, in verschiedenen Amaryllidaceen, Araceen, Leguminosen und Liliaceen³⁹⁾ und in den Früchten der Tomaten, Avocados, roten Pflaumen und Himbeeren.

Das Amin entsteht aus Tyrosin. Eine Tyrosin-Decarboxylase konnte in Gerstenkeimlingen gefunden werden.

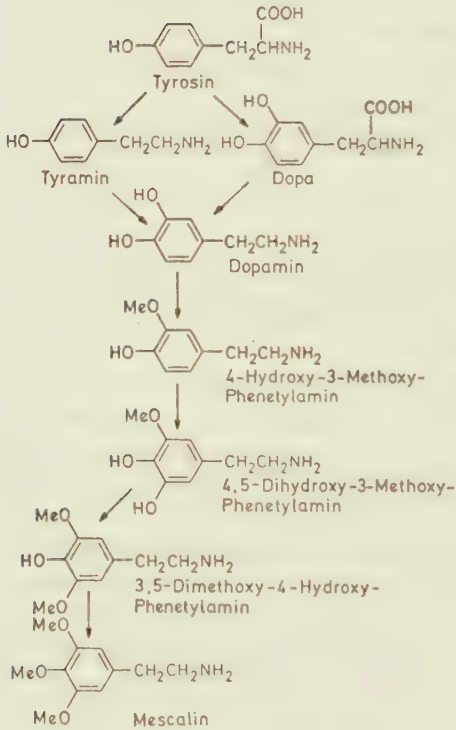
1.2.8. Dopamin

Dopamin ist neben Tyramin in den Schoten des Besenginsters³⁶⁾ zu finden, in größeren Mengen in *Beta vulgaris*, in *Vicia faba*²⁴⁾, *Aconitum napellus*²⁹⁾ und in Bananenschalen¹³⁾.

Dopamin entsteht in *Cytisus* (Geissklee) durch eine Dopadecarboxylase. Aus *Musa sapientium* wurde ein Enzym isoliert, das Tyramin oxydiert. Es wurde festgestellt, daß diese Tyramin-Hydroxylase Dopamin synthetisiert. Wahrscheinlich entsteht als zusätzliches Produkt auch Noradrenalin²⁴⁾.

Eine Anzahl von Cactus-Arten, besonders *Lophophora williamsi*, enthalten N-methylierte, am Aromaten hydroxylierte und methoxylierte Phenyl-aethylamine, von denen das bekannteste das halluzinogen wirkende Alkaloid Mescaline ist^{40) 41)}. Lundström und Mitarb. entwickelten für Mescaline einen Biosyntheseweg, der vom Tyrosin ausgeht. Dieses wird dann entweder zu Dopa hydroxyliert oder zu Tyramin decarboxyliert. Dopamin entsteht entweder aus Dopa oder Tyramin und wird weiter umgebaut zu 4-Hydroxy-3-methoxyphenethylamin und dann zu 4,5-Dihydroxy-3-methoxyphenethylamin. O-Methylierung zuerst in Position 5 ergibt 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenethylamin und in Position 4 dann Mescaline^{24) 42-46)}.

Biosynthese von Mescaline:



1.3. Pharmakologische Eigenschaften der Amine^{50) 51)}

Es ist bekannt, daß einige Amine, wie Histamin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin für die normale Funktion des menschlichen und tierischen Nervensystems eine große Bedeutung haben. Darüber hinaus können sie aber auch von außen in den Organismus gebracht werden und teilweise schon in geringer Konzentration erhebliche pharmakologische Wirkungen auslösen.

1.3.1. Histamin

So diagnostizierte man bei Baumwollmühlenarbeitern gehäuft das Auftreten einer Pneumokoniose (Staublung), die Byssinosis genannt wird. Als Ursache vermutet man den Gehalt an Histamin in den verschiedenen Gossypium-Arten⁴⁷⁾.

Durch Histamin wird ein Teil der glatten Muskulatur direkt erregt. Bronchien, Darm und Uterus werden kontrahiert. An den glatten Muskeln der Gefäße bewirkt Histamin dagegen eine Lähmung. Diese führt zur Vasodilatation, die wiederum Blutdruckabfall und Kopfschmerz bewirkt. Die Drüsen der Magenschleimhaut und der Bronchien werden stark angeregt. Im Magen wird dadurch verstärkt Salzsäure freigesetzt. Sodbrennen und Erbrechen können die Folgen sein. Histamin erhöht auch die Gefäßpermeabilität, sodaß Plasma aus dem Gefäßbett in das Gewebe treten kann, es entstehen Ödeme. Bei Injektion von Histamin in die Haut, beispielsweise durch Brennesselhaare oder Insektenstiche, entstehen durch Kapillardilatation juckende Quaddeln oder Rötungen und lokale Ödeme. Histamin entfaltet in Gegenwart von Alkohol eine toxische Wirkung, die wahrscheinlich darauf

beruht, daß Aethanol und Acetaldehyd monoaminoxidasehemmende Wirkung besitzen, sodaß durch sie ein Abbau der Amine durch blockierte Enzyme verhindert wird. Durch Kumulation werden pharmakologisch relevante Werte erreicht. Dies betrifft besonders den Genuß von Weinen schlechter Qualität, in denen Histamin in Mengen von 7 - 8 mg/Liter nachgewiesen werden konnte^{48) 49)}. Abgesehen von den unerwünschten Effekten wie Kopfschmerzen und Übelkeit ergibt sich das ernste Problem von Leberschädigungen nach chronischem Genuß histaminhaltiger Weine. Verschiedene Autoren sind der Ansicht, daß Histamin bei der Entstehung von Lebererkrankungen (Zirrhosen) eine wesentliche Rolle spielt^{48) 114) 115)}.

1.3.2. Serotonin

Serotonin erregt die glatte Muskulatur. Gefäße, Bronchien, Darm und Uterus kontrahieren im pharmakologischen Versuch nach Zusatz geringer Mengen des Amins. Die Kreislaufwirkungen sind komplex. Sie hängen von der Spezies, vom vegetativen Tonus, von der Applikationsgeschwindigkeit, der Dosis und anderen Faktoren ab.

Serotonin liegt in manchen Geweben in hoher Konzentration vor, besonders in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut. Die Bildung eines Karzinoids durch neoplastische Entartung dieser Zellen führt zu vermehrter Ausscheidung von 5-Hydroxy-indolessigsäure als Serotoninabbauprodukt.

Nach dem Genuß von Bananen sind wegen des ansteigenden Gehaltes von Serotonin und seinen Stoffwechselprodukten im Urin irreführende Krebsdiagnosen gestellt worden^{13) 52)}, bis Waalkes und Mitarb.⁵³⁾ das Amin im Fruchtfleisch der Bananen identifizierten. Nach oraler Gabe ist

Serotonin nicht wirksam, weil es sofort abgebaut wird.

Serotonin findet sich im Gift von Tintenfischen, Wespen, Skorpionen und Spinnen. Es ist eine der stärksten schmerzauslösenden Substanzen, die in der Natur vorkommen⁵⁴⁾.

1.3.3. Noradrenalin

Noradrenalin befindet sich im menschlichen Organismus in den sympathischen Nerven und Ganglien, im Nebennierenmark und in den vegetativen Zellen des Hirnstammes, besonders im Hypothalamus. Es wirkt erregend auf die α -Rezeptoren, über die eine Kontraktion der glatten Muskulatur ausgelöst wird. Ebenso wirkt es stimulierend auf β -Rezeptoren. Am Herzen wird die Schlagfrequenz erhöht (positiv chronotrop) und die Kontraktionskraft verstärkt (positiv inotrop). Eine β -sympathomimetische Wirkung zeigt sich auch an den glatten Muskeln des Magendarmtraktes und der Bronchien, durch die eine Erschlaffung ausgelöst wird. Außerdem kommt es durch β -Rezeptoren zur Steigerung der Lipolyse. Noradrenalin wird im Organismus schnell abgebaut, die pharmakologischen Wirkungen sind von kurzer Dauer.

1.3.4. Tyramin

Tyramin gehört zu den indirekt wirkenden Sympathomimetika, die einen praesynaptischen Angriffspunkt besitzen. Zu den adrenergen Rezeptoren haben sie nur geringe Affinität. Allerdings soll Tyramin in höheren Konzentrationen bis $3 \text{mal } 10^{-3} \text{ M}$ auch einen direkt wirkenden postsynaptischen Effekt haben^{50) 56)}.

Die indirekt wirkenden Sympathomimetika setzen Noradrenalin aus den extraglandulären Speichern frei und erschweren gleichzeitig eine Wiederaufnahme in die Speicher. Nach Entleerung der Speicher geht die Wirkung verloren (Tachyphylaxie).

Pharmakologisch entspricht die Tyraminwirkung der des Noradrenalins. Da Tyramin in manchen Pflanzen, Früchten und Lebensmitteln (Weichkäse) in größeren Mengen von 7 - 95 µg/g vorkommt, kann es bei Patienten, die monoaminoxidasehemmende Medikamente nehmen, durch Kumulation zu lebensbedrohenden Blutdrucksteigerungen kommen, weil der Abbau des Amins verhindert wird⁵⁷⁾.

Der Abbau von Tyramin wird, ebenso wie bei allen Katecholaminen, Phenylaethyl- und Phenylaethanolaminen und beim Serotonin durch die Monoaminoxidase katalysiert, die in den Mitochondrien lokalisiert ist.

1.3.5. Dopamin

Dopamin ist physiologisch eine Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin und wird überwiegend im Nebennierenmark gebildet. Es erregt in hoher Dosierung (500 µg/min i.v.) sowohl α- als auch β-Rezeptoren und ist in seiner Wirkungsqualität dem Noradrenalin vergleichbar.

Unter Dopamin kommt es auch bei geringer Dosierung über spezielle Rezeptoren zu einer selektiven Vasodilatation der Mesenterial- und Nierengefäße ohne Senkung des Blutdruckes. Am Herzen ist die Wirkung positiv inotrop, ohne daß der Sauerstoffbedarf überproportional erhöht wird⁵⁸⁾.

Dopamin hat sich in letzter Zeit als Präparat zur Überwindung kritischer Schockphasen bewährt. Es muß intravenös verabreicht werden. Bei oraler Zufuhr wird es sofort abgebaut.

Birkmayer und Mitarb.⁶⁰⁾ konnten nachweisen, daß Depressionssyndrome auftreten, wenn das Gleichgewicht der biogenen Amine Dopamin und Serotonin, die in kompetitiver Relation stehen, gestört ist. Der Organismus kann sich an Streß und Frustration mit Hilfe der adaequaten Funktionen der biogenen Amine anpassen. Wird die Grenze der Belastbarkeit überschritten, tritt eine Dekompensation ein. Die Autoren beobachteten diese Symptome bei der Therapie des Parkinsonismus mit L-Dopa, der Vorstufe des Dopamins. Unter L-Dopa entwickeln sich häufig depressive Verstimmungen und andere Nebeneffekte wie Schlaflosigkeit, Erregungszustände, Angst, Delirien, Appetitverlust und Anurie. Die Beschwerden gehen zurück, wenn die Dosis reduziert wird.

Andererseits kann im Laufe einer solchen Medikation eine vorher bestehende Depression aber auch verschwinden. Daraus wird geschlossen, daß durch L-Dopa die bestehende biochemische Lage umgeschaltet wird. Im Versuch wurde an Tieren nachgewiesen, daß nach Dopa-Zufuhr im Gehirn Dopamin angereichert und gleichzeitig Serotonin vermindert wird.

Tryptamin, Cadaverin, Putrescin und Aethanolamin haben keine eigene pharmakologische Wirksamkeit. Cadaverin und Putrescin wurden früher als Leichengifte bezeichnet. Sie sind jedoch ungiftig. Putrescin soll aber synergistisch die Histaminresorption im Tierversuch um das 6 bis 10 - fache steigern⁵⁹⁾.

Beim Genuß von Tees oder bei der Therapie mit Präparaten oder Extrakten, die aus aminhaltigen Pflanzen hergestellt werden, muß wegen der zum Teil bedeutenden pharmakologischen Wirkungen mit der Möglichkeit von unerwünschten Nebenwirkungen gerechnet werden. Um beurteilen zu können, ob die Einnahme solcher Drogen oder ihrer Zubereitungen in der üblichen Dosis als bedenklich eingestuft werden muß, bedarf es demnach der quantitativen Bestimmung des Amingehaltes.

1.4. Bisherige analytische Methoden

Zur Auftrennung und qualitativen sowie quantitativen Bestimmung von Amingemischen sind bis heute eine Vielzahl von Methoden vorgeschlagen worden. Sie beweisen, daß der Analytik der biogenen Amine in der Physiologie allgemein und speziell in der Pflanzenphysiologie eine große Bedeutung zukommt.

Die bisher angewandten Methoden der Aminbestimmung wie Photometrie, Fluorometrie, Gaschromatographie, Hochdruckflüssigkeitschromatographie und Elektrophorese basieren nahezu alle darauf, daß die Amine nach Anreicherung aus dem Pflanzenmaterial in Derivate übergeführt werden, die für die jeweilige Methode die günstigsten Eigenschaften aufweisen.

Einige Autoren versuchten auch eine direkte Bestimmung der Amine: Wheaton und Stewart^{39) 61)} durch UV-Spektroskopie. Sie bedienten sich der Durchflußzelle, die an eine Ionenaustauschersäule angekoppelt wurde. Vandekerckhove⁶²⁾, Luckow⁶³⁾ und Rokushika⁶⁴⁾ verwendeten einen Aminosäureanalyser. Sie haben sich aber nicht durchsetzen können.

1.4.1. Photometrie

Zur Photometrie von Aminderivaten hat sich das von Sanger⁶⁵⁾ entdeckte 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (DNFB) besonders bewährt. Es wurde von McIntire und Mitarb.^{66) 67)} erstmals zur Analytik von Aminen eingesetzt. Andere Veröffentlichungen von Dubin⁶⁸⁾ und Lockhart⁶⁹⁾ folgten.

Bräuninger und Spangenberg⁷⁰⁾ untersuchten die allgemeinen Umsetzungsbedingungen für DNFB besonders mit aromatischen Aminen. Richardson⁷¹⁾ analysierte erstmals einfache Amine in Pflanzen mit dieser Methode. Kordts, Voigt und Weiß¹⁵⁾ fanden im Mutterkorn Aethanolamin, Histamin und Tyramin und bestimmten das Histamin quantitativ. Hartmann⁷²⁾ und Ilert⁷³⁾ publizierten umfassende Arbeiten über die quantitative Bestimmung wasserdampfvlüchtiger Amine aus Pflanzen mit Dinitrofluorbenzol. Sie basieren wiederum auf den Untersuchungen von Stein von Kamiensky^{74) 75)}.

Die Dinitrophenyl-Derivate sind auf Chromatogrammen noch bis zu einer Menge von 5 nmol nachweisbar⁷⁶⁾. Eine wesentlich höhere Nachweisgenauigkeit erreichten Seiler und Wiechmann⁷⁷⁻⁷⁹⁾ durch Einführung von 5-Dimethylamino-naphtalin-1-sulfonylchlorid als Kupplungsreagenz (DANS-Cl bzw. Dansyl-chlorid).

1.4.2. Fluorometrie

Dansylchlorid bildet mit Aminen fluoreszierende Verbindungen. Wenn Gemische vorliegen, müssen sie vorher auf Kieselgel-Dünnschichtplatten im Zweidimensional-Verfahren getrennt werden. Die Verbindungen werden der Platte entnommen und dann ihre Intensität am Spektralphotometer mit Fluoreszenzansatz gemessen^{80) 81)}.

Nach Besprühen mit Triaethanolamin:Isopropanol = 20:80 lassen sich die Platten auch direkt durch Transmissionsmessungen auswerten⁸²⁾.

Ein Hauptanwendungsbereich der Methode liegt im Bereich physiologischer Untersuchungen. Sie ist aber sehr zeitaufwendig, weil allein die Umsetzung

der Amine mit dem Reagenz 16 Stunden in Anspruch nimmt. Darüber hinaus müssen die zu untersuchenden Amine sehr sorgfältig von Begleitstoffen gereinigt sein, weil Dansylchlorid sehr empfindlich, aber auch sehr unspezifisch reagiert. Es können so Reaktionsprodukte entstehen, die sich bei der zweidimensionalen Auftrennung mit den DANS-Amiden überlappen. Aus den genannten Gründen hat die Methode noch wenig Eingang in die Phytochemie gefunden¹³⁾.

In neuerer Zeit wurden die Verbindungen Butylamino-Naphtalinsulfonylchlorid⁸³⁾ (BANS-Cl) und Fluorescamin^{84) 85)} in die fluorometrische Analytik eingeführt. Mit Fluorescamin können primäre Amine in reiner Form im Picomol-Maßstab bestimmt werden. Untersuchungen mit diesen Substanzen sind noch im Gange.

In Lebensmitteln ist Tyramin von Sen⁵⁷⁾ und Udenfriend⁸⁶⁾ fluorometrisch bestimmt worden, basierend auf einer Methode von Oates und Spector. Dabei wird das Amin mit Äthylacetat extrahiert und nach Umsetzung mit α -Nitroso- β -naphtol bestimmt. Diese Methode konnte zunächst nicht auf Amingemische übertragen werden, weil eine saubere chromatographische Trennung nicht gelang. Deshalb arbeiteten die Autoren noch an einer gaschromatographischen Bestimmung.

Eine Übersicht der Anwendungsmöglichkeiten der Dünnschicht-Fluorometrie ist von Messerschmidt⁸²⁾ zusammengestellt worden.

1.4.3. Gaschromatographie

Von der Aminosäure- und Peptidanalyse her ist schon lange die Verwendung der Trifluoracetylderivate bekannt. Sie zeichnen sich durch hohe Flüchtigkeit und gute Trenneigenschaften aus. Daneben sind Trifluoressig-

säuremethylester, Trifluoressigsäureäthylester und Trifluoracetylimidazol als Acetylierungsmittel gebräuchlich^{87) 88)}.

Ausführliche Literatur mit Angaben über verschiedene Säulen und Detektoren veröffentlichten Ney und Wirotama^{89) 90)}, Zeman und Wirotama⁹¹⁾, Pailer und Hübsch⁹²⁾ und andere Autoren^{57) 93-97)}.

Bei eigenen Versuchen benützten wir folgende Säule: (nach H. Glasl)

UCCW 982 10% auf Chromosorb WAWDMCS, 80 - 100 mesh.

Wir erreichten damit eine gute Auftrennung der Amine. Schwierigkeiten bereitet jedoch die Bestimmung sehr kleiner und großer Aminmengen nebeneinander, wie sie in Pflanzen oft vorkommen.

In neuerer Zeit ist die Methode durch Einsatz der Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Merzhäuser, Röder und Hesse^{98) 99)} und von Young und McNair¹⁰⁰⁾ erweitert worden. Die Amine werden dazu in Triacetyl-derivate umgewandelt. Die Methode ist zeitsparend. Erfahrungen aus der Pflanzenanalyse liegen bis jetzt noch nicht vor.

1.4.4. Elektrophorese

Auch die Elektrophorese und die Gel-Elektrophorese sind zur Analyse von Aminen herangezogen worden. Mayer und Pause^{16) 49)} bestimmten gel-elektrophoretisch Histamin in Wein und Sauerkraut, nachdem sie das Amin vorher in eine Phthaldialdehyd-Komplexverbindung übergeführt hatten. Die Messung erfolgte auf fluorometrischem Wege durch Vergleich mit gleichzeitig gelaufenen Standardmengen. Faugeras und Mitarb.²⁹⁾ bestimmten Tyramin und Dopamin nach Elektrophorese photometrisch indem sie die Amine mit Ferricyanid bzw. Ninhydrin anfärbten. Sicherlich kommt dieser Bestimmungsmethode aber eine geringere Bedeutung zu.

Die zitierten Verfahren sind ausnahmslos durchführbar, wenn die Amine oder Aminhydrochloride bereits in reiner und ausreichend konzentrierter Form vorliegen. Ein Hauptproblem bei der Analyse von Aminen liegt deshalb in der Anreicherung und quantitativen Abtrennung der Verbindungen aus den Pflanzenauszügen sowie in der Auftrennung der möglicherweise vorliegenden Gemische.

1.4.5. Trennmethoden

Die flüchtigen Amine lassen sich am einfachsten durch Wasserdampfdestillation abtrennen. Man fängt sie in der Vorlage in 0,1 N Salzsäure auf und erhält die Hydrochloride in reiner Form^{72) 74)}. Die nichtflüchtigen Amine können durch Extraktion mit Lösungsmitteln, z. B. kombinierte Äther-Butanol-Extraktion nach Mayer und Pause¹⁶⁾ gewonnen werden.

Viele Autoren bevorzugen Ionenaustauschersäulen: Perry und Luckow beschreiben die Isolierung von Aminen auf schwach sauren Amberlite CG-50 Säulen^{101) 102)}. Auf diesen Säulen werden aliphatische Monoamine aber meist nicht getrennt, weil sie zu schnell ausgeschwemmt werden. Benützt man saure Säulen, dann kann die Bindung an das Harz bei den aliphatischen Diaminen und den aromatischen Aminen so stark sein, daß eine quantitative Extraktion nicht mehr möglich ist. Wheaton und Steward^{39) 61)} trennten phenolische Amine auf einer sauren Polystyrol-SO₃H Säule von anderen aromatischen Aminen.

Awapara und Mitarb.¹⁰³⁾ sowie Kirshner und Goodall¹⁰⁴⁾ verwendeten zur Analyse verschiedener biogener Amine eine schwach saure Säule aus Amberlite IRC 50. Weitere Literatur findet sich unter¹⁰⁵⁻¹¹⁰⁾.

Andere säulenchromatographische Trennverfahren beschreiben Durand und Mitarb.¹¹¹⁾ Sie fanden Tyramin und Dopamin in einigen westindischen Arzneipflanzen, indem sie neben Ionenaustauschern auch Aluminiumhydroxyd als Säulenfüllung benutzten. Awapara und Mitarb.¹⁰³⁾ führten die Aminanreicherung mit einer Cellulosesäule durch, nachdem sie die Aminosäuren vorher über einen Ionenaustauscher abgetrennt hatten.

Den hier aufgeführten Methoden ist gemeinsam, daß sie sich immer nur auf einzelne oder auf mehrere strukturverwandte Amine beziehen.

Ziel unserer Arbeit war es aber, eine Bestimmungs- und Isolierungsmethode auszuarbeiten, mit der möglichst viele der nichtflüchtigen Amine gemeinsam bestimmt werden können.

Es sollten vor allem die aliphatischen primären Mono- und Diamine und aromatische Amine in die Bestimmung miteinbezogen werden.

Von den vorhandenen möglichen Bestimmungsmethoden wählten wir das Verfahren der Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und die photometrische Messung. Sie bietet eine ausreichende Nachweisgenauigkeit und ist mit dem geringsten apparativen Aufwand durchführbar.

Da in manchen Herkunfts- und Anbauländern aufwendige Laborausstattungen nicht unbedingt vorausgesetzt werden können, wurde dies auch eine der Bedingungen für die vorliegende Arbeit.

2.0. Screening der Drogen

2.1. Abtrennung der Amine mit dem Ionenaustauscher

Um eine größere Zahl von Drogen auf das Vorkommen von Aminen prüfen zu können, musste eine Schnellmethode gefunden werden, die bei Einsatz auch kleinerer Drogenmengen empfindlich genug war und auch noch geringe Aminmengen sicher nachzuweisen gestattete.

Zum qualitativen Nachweis von Aminen eignet sich Ninhydrin. Nachteilig ist aber, daß es nicht spezifisch genug ist und z.B. auch mit Aminosäuren und Proteinen unter Bildung rotviolettfarbener Verbindungen reagiert.

Um die Aminosäuren abzutrennen, die den Nachweis der Amine stören, verwendeten wir die Ionenaustauscher-Chromatographie, die von Wheaton und Stewart³⁹⁾ zuerst entwickelt wurde. Wir variierten sie für unsere Zwecke.

Die Methode basiert darauf, die Aminosäuren und die Amine gemeinsam an einen schwach sauren Ionenaustauscher zu binden, die Aminosäuren soweit wie möglich auszuwaschen und anschließend die Amine zu eluieren:

2.5 Gramm gepulverte oder geschnittene Droge werden hierzu auf dem Dampfbad mit Wasser extrahiert. Die Ballaststoffe zentrifugiert man ab und der Extrakt wird auf eine Amberlite IRC 50 Säule gegeben. Den Extrakt lässt man mit einer Geschwindigkeit von 20 Tropfen pro Minute durch die Säule fließen. Man spült mit reichlich Wasser nach und wäscht die Amine mit 4,5 N NH_4OH aus. Ihr Nachweis erfolgt dünnschichtchromatographisch.

2.2. Dünnschichtchromatographie

Für die Chromatographie wurden verschiedene Laufmittel vorgeschlagen, besonders Variationen des Laufmittels Butanol:Eisessig:H₂O^{39) 61) 112)}. Entwickelt werden die Substanzen entweder auf Papier, das mit 2%iger Lösung von Natriumphosphat getränkt ist, auf Kieselgelplatten oder auf Aluminiumfolien.

Nach Testung aller Systeme wählten wir das von Mayer und Pause verwendete Verfahren aus. Die Auftrennung erfolgt auf Alufolien Merck ohne Fluoreszenzindikator. Dazu stehen zwei gleichwertige Fließmittel zur Verfügung¹¹³⁾:

- 1) n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H₂O = 60:8:12:20 oder
- 2) 2-Methyl-3-butin-2-ol:Ameisensäure:H₂O = 75:5:20

Bei einer Laufstrecke von 14 cm beträgt die Laufzeit bei beiden Gemischen 4 bis 5 Stunden. Die Folien werden mit dem Calciumacetat-Ninhydrin-Reagenz oder mit Folin-Reagenz bis zur Transparenz besprüht. Die mit Ninhydrin besprühten Platten müssen im Trockenschrank bei 100° C entwickelt werden.

Die Auswertung geschieht in der üblichen Weise durch Vergleich der mitchromatographierten Testlösungen.

2.2.1. Fixieren der Ninhydrinflecken

Die Ninhydrinflecken haben die Eigenschaft, an Licht schnell und im Dunkeln allmählich zu verblassen. Außerdem lassen sich die Aluminiumfolien schlecht aufbewahren, da die Beschichtung spröde und kaum abriebfest ist. Bei dem Bemühen, die Platten zur Dokumentation haltbar zu

machen, experimentierten wir mit verschiedenen Sprühlacken. Dabei stellte sich heraus, daß die Farben nach dem Besprühen mit "Camag Sprühlack" am Licht wesentlich langsamer verblassten und beim Aufbewahren im Dunkeln und in abgeschlossenen Systemen über Monate ihren Farbton behielten.

In den nachstehenden Tabellen sind die Rf-Werte der ausgewählten Amine in beiden Systemen und ihr Farbverhalten mit Ninhydrin und Folin Reagenz zusammengestellt.

2.2.2. DC-Charakteristika einiger biogener Amine

1. Laufmittel

Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O = 60 : 8 : 12 : 20

Sprühreagenz: Ninhydrin-Cadmiumacetat

	Rf	Farbe
Tryptamin	0,74	grauviolett
Tyramin	0,68	violett
Serotonin	0,53	blauviolett
Dopamin	0,60	braunviolett
Noradrenalin	0,38	beigerot
Aethanolamin	0,33	rot
Histamin	0,24	blauviolett
Cadaverin	0,23	rot
Putrescin	0,21	rotviolett

2. Laufmittel

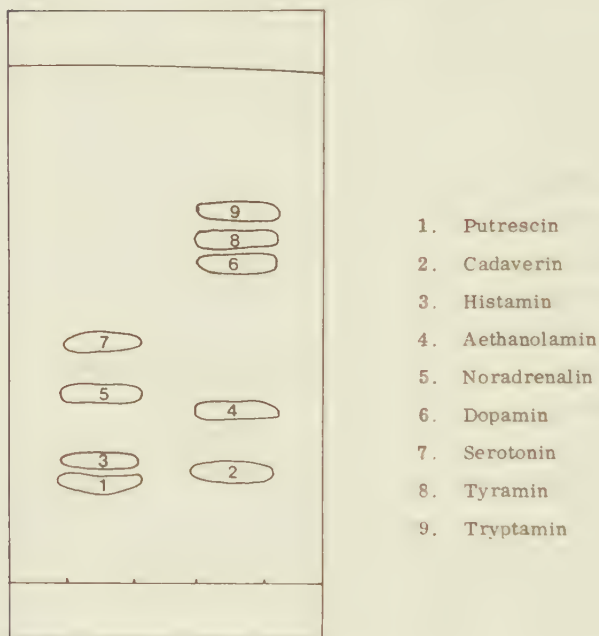
2-Methyl-3-butan-2-ol : Ameisensäure : H_2O = 75 : 5 : 20

Sprühreagenz: Folin

	Rf	Farbe
Tryptamin	0,80	graublau
Tyramin	0,72	graublau
Serotonin	0,52	graugrün
Dopamin	0,63	gelbbraun
Noradrenalin	0,35	braun
Aethanolamin	0,40	kornblumenblau
Histamin	0,25	graublau
Cadaverin	0,31	taubenblau
Putrescin	0,44	graublau

Die nachfolgende Abbildung gibt eine Übersicht über die Auftrennbarkeit der Amine im 1. Laufmittel:

Chromatogramm der Amine im 1. Laufmittel



2.2.3. Auswertung der Chromatogramme

Die Auswertung der Chromatogramme ergab, daß die Amine Histamin, Cadaverin und Putrescin sehr nahe beieinanderliegende R_f -Werte haben. Beim Besprühen mit Ninhydrin- und Folin Reagenz aber lassen sie sich durch ihre verschiedene Farbigkeit durchaus unterscheiden. Die darüberliegenden Aminflecken von Aethanolamin bis Tryptamin sind gut voneinander getrennt.

Komplizierter wird die Auswertung bei der Chromatographie von Pflanzenauszügen. Da die im Rf-Bereich von 0,10 bis 0,27 liegenden Aminosäuren aus der Ionenaustauschersäule nicht vollständig ausgewaschen werden, können diese bei der Identifizierung der Amine stören. Meist sind die Aminosäureflecken aber so diffus und schwach ausgebildet, daß die Amine klar erkannt werden.

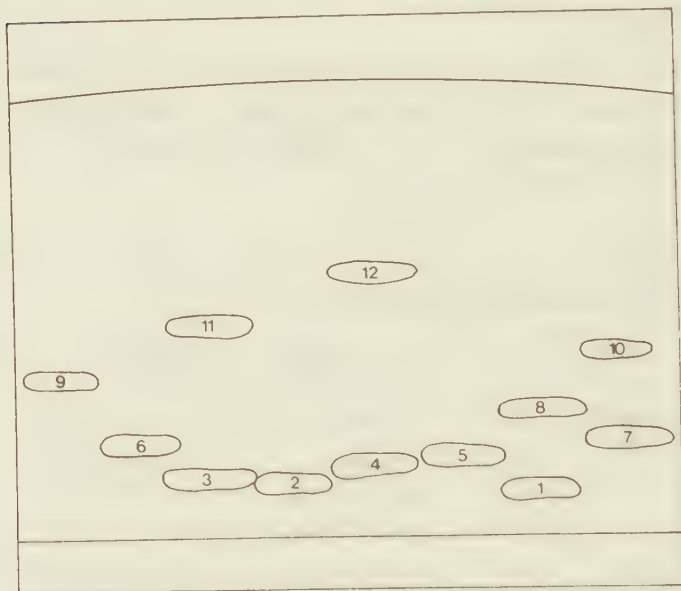
Die Tabelle zeigt die Rf-Werte der wichtigsten in Pflanzen vorkommenden Aminosäuren und ihre Anfärbbarkeit mit Ninhydrin- und Folin Reagenz. In der folgenden Abbildung ist das Chromatogramm wiedergegeben.

2.2.4. DC-Charakteristika einiger Aminosäuren

	Rf	Folin Reagenz	Ninhydrin
Asparaginsäure	0,1	violettrot	violettrot
Lysin	0,12	taubenblau	dunkelrot
Glycin	0,13	helltaubenblau	gelbrot
Arginin	0,15	gelblichbraun	rot
Glutaminsäure	0,18	graublau	rot
Threonin	0,21	hellgrau	rot
Alanin	0,23	taubenblau	violettrot
Prolin	0,27	rosarot	gelb
Tyrosin	0,34	hellrot-braun	violett
Methionin	0,4	graugrün	dunkelrot
Valin	0,45	graubraun	rot
Isoleucin	0,56	grau	rot

Chromatogramm der Aminosäuren

Fließmittel: Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O = 60 : 8 : 12 : 20



1. Asparaginsäure

2. Lysin

3. Glycin

4. Arginin

5. Glutaminsäure

6. Threonin

7. Alanin

8. Prolin

9. Tyrosin

10. Methionin

11. Valin

12. Isoleucin

Mit dieser Screening-Methode untersuchten wir eine größere Anzahl von Pflanzen. Sie wurden teilweise frisch, größtenteils aber getrocknet verarbeitet.

2.2.5. Diskussion der Ergebnisse

Eine Übersicht ist in der Tabelle 2.2.6 zusammengestellt. Sie zeigt, daß die meisten untersuchten Drogen Aethanolamin enthalten, das bis jetzt als Pflanzeninhaltsstoff nur selten beschrieben wurde.

Verbreitet ist auch das pharmakologisch bedeutende Tyramin zu finden. Es wurde nachgewiesen in:

Flores Hibisci, Hb. Cardui mariae, Hb. Polygoni avicularis, Hb. Heliospermae quadrident., Hb. Sarothamni scoparii, Hb. Geranii robertiani, Hb. Limonii vulgare, Folia Rubi idae, Hb. Genistae tinct., Radix Pelargonii reniforme, Folia Ephedrae und in frisch gesammelten Pflanzenteilen von Aconitum napellus, Epilobium hirsutum, Genista tinctoria, Cichorium intybus, Ononis spinosa, Solanum lycopersicum und Brunfelsia grandiflora.

Bei Solanum lycopersicum, Limonium vulgare und Sarothamnus scoparius wurden Dopamin, bei Solanum lycopersicum auch Tryptamin, bei Limonium vulgare und Solanum lycopersicum Cadaverin, bei Brunfelsia grandiflora Putrescin und bei Aconitum napellus Spuren von Noradrenalin gefunden.

Bis jetzt noch nicht beschrieben wurde unseres Wissens das Vorkommen von Tyramin in Flores Hibisci, Heliosperma quadridentatum, Limonium vulgare, Cichorium intybus und Brunfelsia grandiflora. Tyramin und Aethanolamin in Pelargonium reniforme wurden in unserer Arbeitsgruppe entdeckt¹¹⁶⁾. Noch unbekannt war bisher auch das Vorkommen von Dopa-

min und Cadaverin in *Limonium vulgare* und von Cadaverin in *Brunfelsia grandiflora*.

2.2.6. Zum speziellen Nachweis von Aethanolamin

Für Aethanolamin wird von Neu¹⁴⁾ ein spezifisches Nachweisreagenz beschrieben: Die Amine werden auf einem mit 2%igem wässrigen, sekundären Natriumphosphat imprägnierten Papier von Schleicher und Schüll NR 2043 BM getrennt. Das Papier wird mit Isatinlösung (keine Konzentrationsangabe) getränkt und dann getrocknet. Aethanolamin soll demnach in Mengen ab 5 γ mit Isatin zu rotvioioletten Flecken reagieren.

Beim Nacharbeiten dieser Vorschrift konnten die Resultate nicht bestätigt werden. Auf der Tüpfelplatte kommt die Reaktion erst bei starker Konzentration von Aethanolamin nach einigen Minuten in Gang.

Weder auf dem imprägnierten Papier, noch auf DC-Alufolien kommt es zur gewünschten Umsetzung, auch nicht, wenn man verschiedene Konzentrationen von Isatinlösungen in Alkohol-Wasser verwendet und die Platten im Trockenschrank erhitzt.

Statt dessen färbte sich beim Erhitzen der Platte eines *Crataegus*-Chromatogramms unterhalb des zu erwartenden Aethanolamin-Fleckes in Höhe des R_f -Wertes 0,27 eine Substanz blau (R. Neu verwendete für seine Untersuchungen ebenfalls einen *Crataegus*-Auszug). Mit Folins-Reagens identifizierten wir die Substanz als die Aminosäure Prolin. Prolin wird nach dem Besprühen mit Folins-Reagens charakteristisch rosarot.

Ein Auskratzen der Aethanolaminzonen und Rechromatographie in einem anderen Fließmittelsystem mit einer Vergleichssubstanz kommt wegen

der Oxydationsempfindlichkeit des Amins nicht in Frage, sodaß zur Bestätigung der Ergebnisse die Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol herangezogen werden muß. Dies gilt auch für die übrigen Amine.

2.2.7. Übersichtstabelle zum Screening der Drogen

Droge		Aethanolamin	Tyramin	sonstige
1.	Flor. Hibisci	(Spuren)	+	-
2.	Hb. Cardui mariae	+	+	-
3.	Hb. Polygoni avic.	+	(Spuren)	-
4.	Hb. Limonii vulg.	+	+	Dopamin
5.	Tub. Aconiti (Frischdroge)	+	+	-
6.	Hb. Heliospermae	+	+	-
7.	Cort. Hamamelidis	(Spuren)	-	-
8.	Rad. Scopoliae	+	-	-
9.	Hb. Urticae	+	-	-
10.	Hb. Sarothamni scoparii	+	+	Dopamin
11.	Flor. Sarothamni	+	-	-
12.	Hb. Bursae past.	+	-	-
13.	Fol. Rubi frutic.	+	-	-
14.	Fruct. Piri mali	-	-	-
15.	Hb. Geranii rob.	+	(Spuren)	-
16.	Fol. Rubi idae	+	(Spuren)	-
17.	Rad. Harpagophyt. procumb.	+	-	-
18.	Hb. Meliloti off.	-	-	-

Droge		Aethanolamin	Tyramin	sonstige
19.	<i>Epilobium hirsutum</i> (Frischdroge)	+	-	-
20.	<i>Urtica dioica</i> (Frischdroge)	+	-	-
21.	<i>Lysimachia vulg.</i> (Frischdroge)	+	-	-
22.	Hb. <i>Genistae tinct.</i>	+	-	-
23.	<i>Genista tinctoria</i> (Frischdroge)	+	-	-
24.	<i>Cichorium intybus</i> (Frischdroge)	+	-	-
25.	<i>Lythrum salicaria</i> (Frischdroge)	+	-	-
26.	<i>Astrantia major</i> (Frischdroge)	+	-	-
27.	<i>Filipendula ulmar.</i> (Frischdroge)	+	-	-
28.	<i>Radix Pelargon. ren.</i>	+	-	-
29.	<i>Solanum lycopers.</i> (Frischdroge)	+	-	Dopamin Cadaverin
30.	<i>Melaleuca quinquen.</i>	+	-	-
31.	<i>Ononis spinosa</i> (Frischdroge)	+	(Spuren)	-
32.	<i>Sorbus aucuparia</i> (Frischdroge)	-	-	-
33.	Hb. <i>Polygoni hydropip.</i>	+	-	-
34.	<i>Symphyt. officinal.</i> (Frischdroge)	+	-	-
35.	<i>Rad. Panax Ginseng</i>	+	-	-
36.	Hb. <i>Senecionis jac.</i>	-	-	-

	Droge	Aethanolamin	Tyramin	sonstige
37.	Rumex acetosa Kraut, (Frischdroge)	+	-	-
38.	Stachys betonica Kraut, blühend, (Frischdroge)	+	-	-
39.	Phyllophora nervos. (Rotalge)	-	-	-
40.	Sem. Cardui Mariae	+	+	-
41.	Flor. Crataegi oxy.	+	-	-
42.	Semen Colae	+	-	-
43.	Hb. Visci albi	+	-	-
44.	Flor. Arnicae	+	-	-
45.	Flor. Millefolii	+	-	-
46.	Fol. Farfarae	+	-	-
47.	Fol. Ephedrae	+	+	-
48.	Flor. Verbasci	+	-	-
49.	Hb. Convallariae	+	-	-
50.	Fruct. Piperis nigr.	+	-	-
51.	Solanum lycopers. blühend. Kraut (Frischdroge)	+	+	Dopamin Cadaverin Tryptamin
52.	Fol. Cassine mat.	-	-	-
53.	Rad. Cassine mat.	-	-	-
54.	Rad. Cassine aeth.	+	-	-
55.	Rad. Cassine transvaal.	-	-	-

3.0. Bestimmung von Aminen mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

3.1. Zur Reaktionsfähigkeit des DNFB

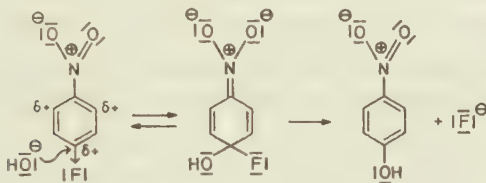
Bräuninger und Spangenberg⁷⁰⁾ veröffentlichten 1957 eine Arbeit, in der die Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von Aminen, insbesondere von aromatischen Aminoverbindungen, mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol untersucht wurden.

DNFB reagiert mit alkoholischen und phenolischen Hydroxylgruppen, mit primären und sekundären Aminogruppen sowie mit Ammoniak unter Substitution von jeweils einem Proton durch die 2,4-Dinitrophenylgruppe.

Die Reaktionsfähigkeit des 2,4-Dinitrofluorbenzols beruht auf der lockeren Bindung des Fluoratoms, die durch den Polarisierungseffekt der beiden Nitrogruppen am aromatischen Kern bewirkt wird. Die p-Nitrogruppe übt dabei den stärksten aktivierenden Effekt aus. Im Gegensatz zu den einfachen Halogenbenzolen vermindert sich nämlich beim Halogendinitrobenzol die Bindungsfestigkeit am aromatischen Kern in der Reihenfolge $J > Br > Cl > F$ ¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾, während gleichzeitig die nukleophile Aktivität in derselben Reihenfolge steigt.

Nach Chapman und Parker¹¹⁷⁾ ist die Aktivierungsenergie des DNFB um 5000 cal kleiner als die des 2,4-Dinitrochlorbenzols. 2,4-Dinitrobrom- und -jodbenzol benötigen erheblich höhere Aktivierungsenergien. Dagegen kommt es beim DNFB schon beinahe zur Dissoziation der Fluorkomponente⁷⁰⁾, was durch die Neigung des Fluorions zu Solvation noch verstärkt wird.

Die Umsetzung mit einem nukleophilen Agens geht nach Bunnet und Davis¹²⁰⁾ bei Anwendung der Ingold'schen Klassifizierung nach einem bimolekularen Mechanismus vor sich:



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der S_N2 -Reaktion ist die Bildung des Übergangszustandes (transition state), an dessen Entstehung beide Reaktionspartner beteiligt sind. Im Gegensatz zur S_N2 -Reaktion und in Analogie zum σ -Komplex der elektrophilen aromatischen Substitution stellt der Übergangszustand aber eine echte Zwischenverbindung dar. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt demnach sowohl vom Elektronendruck des nukleophilen Partners, als auch von dem Elektronen zug ab, der innerhalb des Aromaten auf das Reaktionszentrum ausgeübt wird.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist auch abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner. Bräuninger und Spangenberg bestätigten, daß bei Erhöhung des Anteils eines Reaktionspartners auf das Mehrfache auch die Reaktionsgeschwindigkeit im gleichen Maße zunahm. Ebenso sprach die Temperaturabhängigkeit der Umsetzung nach Ansicht der Verfasser für eine Reaktion höherer Ordnung.

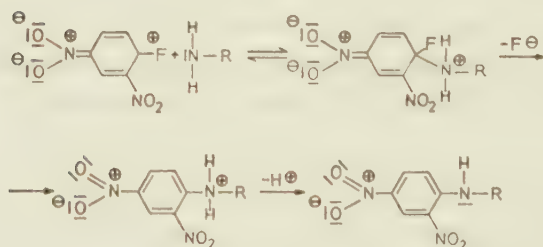
Bei der Umsetzung von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol spielt die Wasserstoffionenkonzentration insofern eine Rolle, als die Reaktionsgeschwindigkeiten

und die Ausbeuten mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration steigen. Bei saurem pH erhöht sich nämlich die Konzentration der R-NH_3^+ Ionen und diese verhält sich umgekehrt proportional zur Ausbeute des DNP-Amins.

Sind vorwiegend Ammoniumsalze in der Lösung vorhanden, kann keine Reaktion mit dem 2,4-Dinitrofluorbenzol eintreten, weil zur Bildung des Intermediärproduktes das freie Elektronenpaar des Stickstoffes notwendig ist.

Deshalb wird der Reaktionslösung zum Abfangen der Wasserstoffionen das schwach basische NaHCO_3 beigegeben, wodurch bei den Aminen die Bildung des Ammoniumsalzes verhindert wird. Es hält die Lösung annähernd neutral.

Nicht gelöstes Hydrogencarbonat geht beim Ausfällen der 2,4-Dinitrophenylverbindung mit Wasser und Säure in Lösung.



3.2. Herstellung der DNP-Testsubstanzen

Die Dinitrophenylverbindungen der Amine haben wir aus den betreffenden Aminhydrochloriden hergestellt, diese konnten in "pro analysi" Qualität bezogen werden.

Zur Darstellung der DNP-Testsubstanzen werden in einem Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen je 2 mMol Aminhydrochlorid in 20 ml Wasser gelöst. Dazu pipettiert man 15 Tropfen 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, entsprechend 2,5 mMol. Diese Lösung stellt man 40 Minuten in ein Wasserbad von 60°C, setzt den Stopfen locker auf und ergänzt nach 10 Minuten mit 5 bis 8 ml Aceton. Von Zeit zu Zeit wird die Lösung vorsichtig geschüttelt.

Aufgrund von Literaturangaben musste davon ausgegangen werden, daß bei den zu untersuchenden Aminen teilweise mit einer Mehrfachsubstitution durch das DNFB zu rechnen war. Asatoor¹²¹⁾ und Kordts¹⁵⁾ stellen z.B. Bis-dinitrophenylderivate von Histamin, Cadaverin und Putrescin her. Dieselben Autoren beschreiben aber für Tyramin nur ein Monosubstitutionsprodukt, sodaß hier an der p-ständigen Hydroxylgruppe keine Substitution stattgefunden hätte.

Deshalb wurden die Aminhydrochloride von Histamin, Cadaverin, Putrescin, Noradrenalin, Dopamin und Tryptamin nach folgender Vorschrift umgesetzt: In einem verschließbaren Erlenmeyerkolben werden 2 mMol des Aminhydrochlorids in 20 ml Aceton und 4 mMol NaHCO_3 in 20 ml H_2O zusammen gelöst, dazu 30 Tropfen DNFB, entsprechend 5 mMol, gegeben und die Lösung 40 Minuten bei 60°C im Wasserbad gehalten. Anschließend gibt man eine Messerspitze Natriumhydrogencarbonat dazu und läßt auf Zimmertemperatur abkühlen.

Die entstehenden Dinitrophenylamine fallen mit Ausnahme derer von Aetha-

nolamin, Noradrenalin und Dopamin, spontan aus. Man lässt sie über Nacht aus der Mutterlauge vollkommen auskristallisieren.

DNP-Dopamin und DNP-Noradrenalin

DNP-Dopamin und DNP-Noradrenalin kristallisierten nicht sofort aus. In den Lösungen bildete sich statt dessen eine ölige braune Masse. Die Gemische wurden daher in Schütteltrichtern von 250 ml Inhalt mit kleinen Portionen Aether ausgeschüttelt, bis die Aetherphasen farblos waren. Diese wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, durch Glasfrittenfilter mit der Porengröße G3 abgenutscht und am Rotationsverdampfer bei 45 °C eingeengt.

In den Kolben verblieb eine gelbe ölige Masse. Der Versuch, diese mit Aether wieder zu lösen, schlug fehl, aber sie löste sich in heißem Methanol, wobei sich allerdings wieder einige braune, schmierige Klumpen bildeten. Die klaren gelben Überstände wurden als Mutterlaugen in 250 ml Erlenmeyerkolben dekantiert und auf dem Dampfbad unter dem Abzug eingeengt, bis sie konzentriert genug waren. Über Nacht kristallisierten die Dinitrophenylamine aus.

Die braunen Klumpen lösten sich ebenfalls nach und nach in heißem Methanol. Ihre methanolischen Lösungen wurden über Wasserdampf eingeengt und die gewonnenen Kristalle mit den aus den Mutterlaugen gewonnenen chromatographisch verglichen. Es zeigte sich, daß die Kristalle aus der Mutterlauge weniger verunreinigt waren. Da es uns auf eine quantitative Ausbeute nicht ankam, wurden deshalb die nachträglich gewonnenen Kristalle verworfen.

Das Umkristallisieren von DNP-Noradrenalin und DNP-Dopamin macht insofern Schwierigkeiten, als sich die beiden Substanzen zwar in Aceton lösen, aber daraus nicht rekristallisiert werden können. Andererseits ist die Löslichkeit in Methanol so schlecht, daß man sehr große Mengen einsetzen muß.

Darum lösten wir die Kristalle, die vorher auf einer Glasfritte von der Mutterlauge abgenutscht und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet worden waren, in einem Erlenmeyerkolben in wenig heißem Aceton, engten dann die acetonische Lösung auf dem Dampfbad auf wenige Milliliter ein, gaben 50 ml Methanol hinzu und konzentrierten diese Lösung über Wasserdampf soweit wie nötig. Die DNP-Amine rekristallisierten über Nacht.

DNP-Aethanolamin

Das DNP-Aethanolamin wird durch Ausschütteln mit kleinen Portionen Aether gewonnen. Man extrahiert in einem Schütteltrichter solange, bis die Aetherphase farblos ist. Die vereinigten Aetherextrakte wurden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand, eine ölige gelbe Masse, wurde in wasserfreiem Aether nochmals aufgenommen und man erhielt nach dem erneuten Einengen ein trockenes Produkt, das aus heißem 2,2-sym-Tetrachloraethan auskristallisierte.

Die DNP-Amine von Tyramin, Tryptamin, Serotonin, Cadaverin, Histamin und Putrescin ließen sich aus Aethylmethylketon (2-Butanon) umkristallisieren. Mit Ausnahme von DNP-Tyramin und -Tryptamin, die leicht löslich sind, mussten die DNP-Amine zerrieben werden. Sie wur-

den in kleinen Anteilen in einem Erlenmeyerkolben in 150 ml des heißen Lösungsmittels nach und nach aufgelöst. Dann engt man die Lösungen wie beschrieben ein und lässt die DNP-Amine über Nacht auskristallisieren.

Alle Präparate wurden 3mal umkristallisiert. Nach jedem Vorgang wurden die Kristalle abgenutscht und im Trockenschrank bei 45°C getrocknet. Die Ausbeuten lagen zwischen 40 und 70% der Theorie.

Die Reinheit der Substanzen muß dünnstschichtchromatographisch überprüft werden. Wir verwendeten dazu das Laufmittel Toluol : Äthylacetat = 50 : 40.

Zur Lagerung kamen die Kristalle in einen Exsiccator über Phosphor-pentoxid.

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Kofler-Heiztischmikroskop bestimmt und mit den bisher veröffentlichten verglichen.

Schmelzpunkte der DNP-Amine

Substanz	Farbe	Fp. gefunden	Fp. der Literatur	
DNP Äthanolamin	goldgelb	89,5	92	-
DNP Noradrenalin	goldgelb	111 - 114	-	-
DNP Dopamin	gelb	166	-	-
DNP Tyramin	goldgelb	168	156	165
DNP Cadaverin	goldgelb	178,5	173	232
DNP Histamin	rotbraun	214	195 (zersetzt)	216 - 217
DNP Tryptamin	rostrot	222 - 223	217	-
DNP Putrescin	gelb	237	182 (zersetzt)	239
DNP Serotonin	rot	275	-	-
			nach ¹²¹⁾ Asatoor	nach ¹⁵⁾ Kordts

Die zitierten Autoren geben an, daß Histamin, Putrescin und Cadaverin in den Kupplungsprodukten als bis-DNP-Amine vorliegen, während Tyramin ein Monosubstitutionsprodukt liefern sollte. Allerdings wird von Kordts und Mitarb. beim DNP-Tyramin auch ein Mischprodukt aus n-DNP- und bis-DNP-Tyramin in Betracht gezogen.

Von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin war bis jetzt nicht bekannt, in welcher Form sie mit Dinitrofluorbenzol reagieren.

3.3. Die Strukturen der DNP-Amine

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung der Amine ist die Kenntnis ihrer Struktur und damit ihrer Molekulargewichte.

Da nicht in jedem Falle bekannt war, wie die Amine mit dem Dinitrofluorbenzol reagieren, d.h. wie z.B. die phenolischen Hydroxylgruppen der aromatischen Amine unter den geschilderten Reaktionsbedingungen mit dem 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol reagieren, haben wir alle synthetisierten Dinitrophenylamine analysiert. Zu diesem Zweck wurden die NMR-Spektren der Substanzen aufgezeichnet.

3.3.1. Ergebnisse der NMR-Spektren

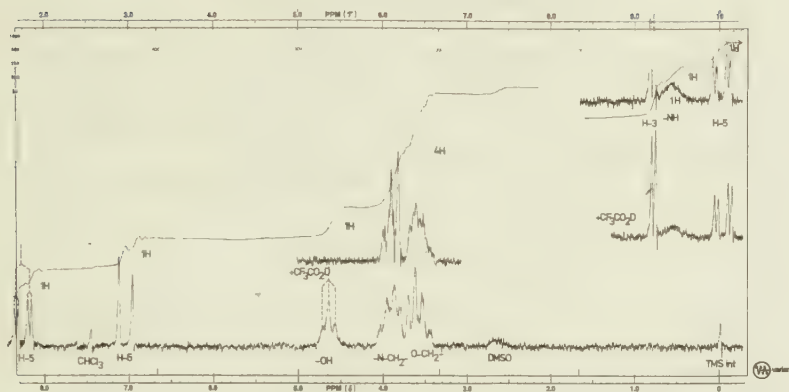
Die Auswertung der NMR-Spektren der DNP-Amine ergab für Aethanolamin, Tyramin und Serotonin ein Monosubstitutionsprodukt.

Putrescin und Cadaverin lieferten erwartungsgemäß ein Disubstitutionsprodukt, ebenso Histamin und Tyramin. Dopamin und Noradrenalin liegen dreifach substituiert vor.

Aethanolamin reagiert demnach mit Dinitrofluorbenzol nur mit seiner NH_2 -Gruppe und nicht mit der OH-Gruppe, weil sich die Reaktion im neutralen Milieu abspielt und deshalb eine Bildung des Alkoxyds unter Dissoziation des Wasserstoffs nicht möglich ist.

Anders verhalten sich die phenolischen Amine, deren Hydroxylgruppen das Phenoxyd bilden können, da sich die freien Elektronen des Sauerstoffes durch Mesomerie im Kern stabilisieren können. Die phenolischen Gruppen sind deshalb zu einer nukleophilen Reaktion befähigt.

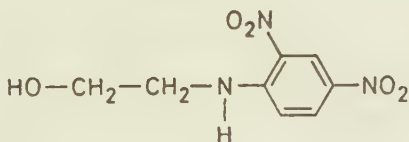
NMR-Spektrum von DNP-Aethanolamin



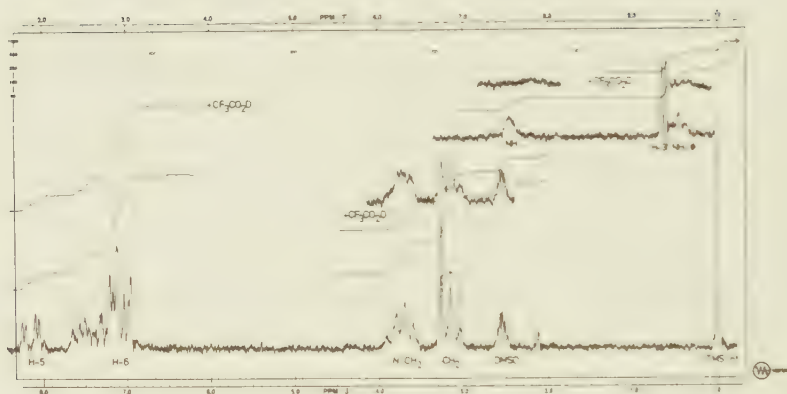
Diskussion:

ppm	Protonen	Bezeichnung
9,13	d, $J = 3 \text{ Hz}$, 1 H	H - 3
8,93	b, 10 Hz, 1 H	NH
8,32	dd, $J_{3,5} = 3 \text{ Hz}$, $J_{5,6} = 9,5 \text{ Hz}$, 1 H	H - 5
7,05	d, $J = 9,5 \text{ Hz}$, 1 H	H - 6
4,65	t, $J = 4 \text{ Hz}$, 1 H, verschwindet nach Zusatz von CF_3COOD	OH
3,90	m, 2 H	-N-CH ₂
3,63	m, 2 H	-O-CH ₂

Struktur:



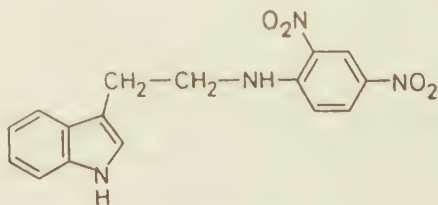
NMR-Spektrum von DNP-Tryptamin



Diskussion:

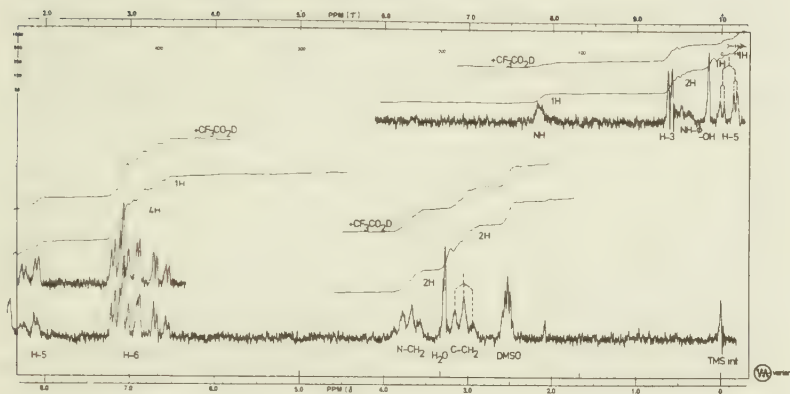
ppm	Protonen	Bezeichnung
10,78	b, 8 Hz, 1 H	NH - Indol
9,46	d, $J = 3$ Hz, 1 H	H - 3
8,78	sehr breit, 1 H	NH
8,18	dd, $J_{3,5} = 3$ Hz, $J_{5,6} = 9,5$ Hz, 1 H	H - 5
6,9-7,70	5 H	H - 6 + Indolprotonen
3,10	t, $J = 6,5$ Hz, 2 H	C-CH ₂

Struktur:



Dinitrophenyl-Tryptamin MG 326,32

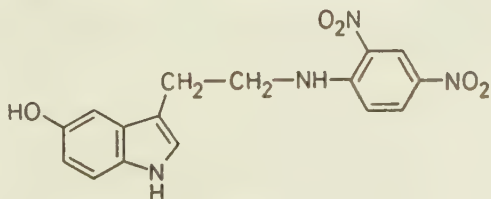
NMR-Spektrum von DNP-Serotonin



Diskussion:

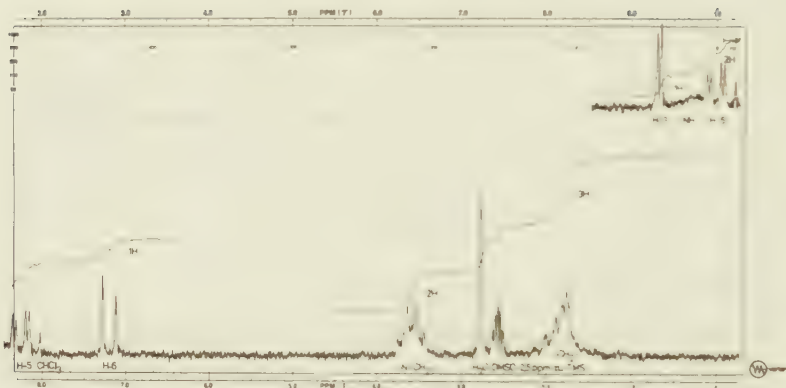
ppm	Protonen	Bezeichnung
10,48	b, 8 Hz, 1 H	NH
8,93	d, $J = 3$ Hz, 1 H	H - 3
8,75	sehr breit, 1 H	NH
8,48	s, 1 H, verschwindet nach Zusatz von CF_3COOD	OH
8,20	dd, $J_{3,5} = 3$ Hz, $J_{5,6} = 9,5$ Hz, 1 H	H - 5
6,5-7,30	4 H	H - 6 + Indolprotonen
3,70	m, 2 H	-N-CH ₂
3,08	t, $J = 6,5$ Hz, 2 H	-C-CH ₂

Struktur:



Dinitrophenyl-Serotonin MG 342,39

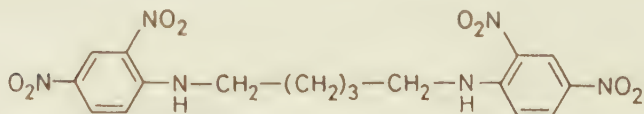
NMR-Spektrum von DNP-Cadaverin



Diskussion:

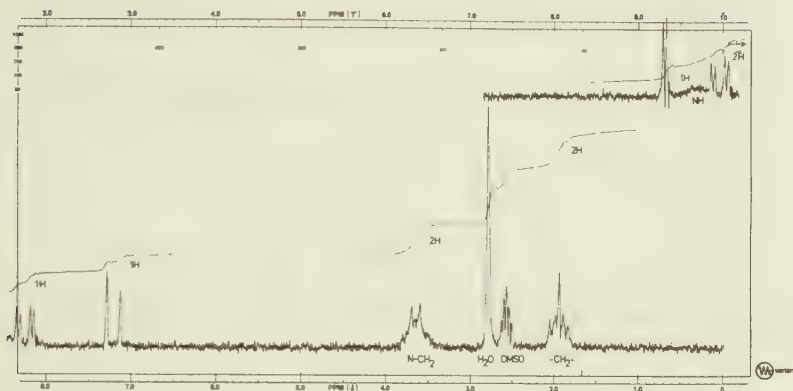
ppm	Protonen	Bezeichnung
9,00	d, $J = 3 \text{ Hz}$, 2 H	H - 3, H - 3
8,63	sehr breit, 2 H	2mal NH
8,31	dd, $J_{3,5} = 3 \text{ Hz}$, $J_{5,6} = 9,5 \text{ Hz}$, 2 H	H - 5, H - 5
7,20	d, $J = 9,5 \text{ Hz}$, 2 H	H - 6, H - 6
3,60	m, 4 H	2mal -N-CH ₂
1,80	m, 6 H	(CH ₂) ₃

Struktur:



bis-Dinitrophenyl-Cadaverin MG 434,38

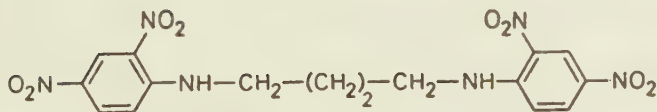
NMR-Spektrum von DNP-Putrescin



Diskussion:

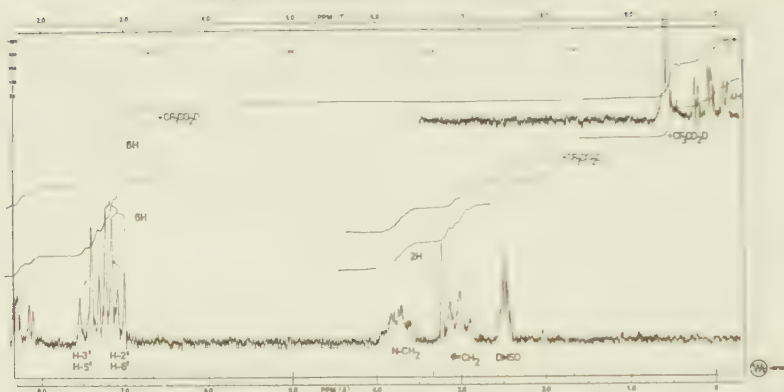
Das NMR-Spektrum von DNP-Putrescin ist identisch mit dem NMR-Spektrum von bis-Dinitrophenyl-Cadaverin, mit Ausnahme des Integrals beim Multipllett 1,90 ppm, das 4 H entspricht.

Struktur:



bis-Dinitrophenyl-Putrescin MG 420,35

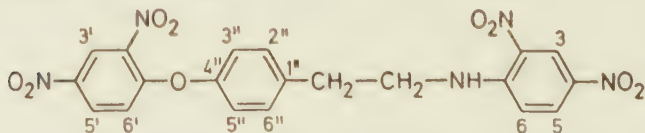
NMR-Spektrum von DNP-Tyramin



Diskussion:

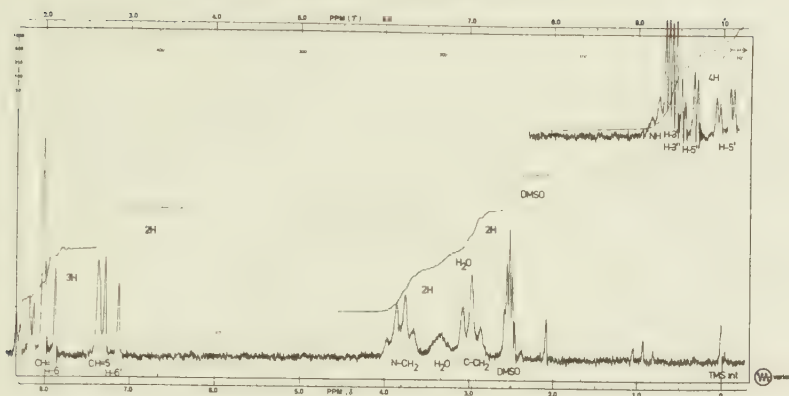
ppm	Protonen	Bezeichnung
8,90	d, $J = 4$ Hz, 2 H	H - 3', H - 3
8,78	b, 1 H	NH-
8,10-8,65	2 H	H - 5, H - 5'
7,47	d, $J = 9$ Hz, 2 H	H - 3'', H - 5''
7,17	d, $J = 9$ Hz, 2 H	H - 6', H - 6
7,10	d, $J = 9$ Hz, 2 H	H - 2'', H - 6''
3,70	m, 2 H	N-CH ₂
3,05	t, $J = 7$ Hz, 2 H	O-CH ₂

Struktur:



bis-Dinitrophenyl-Tyramin MG 469,38

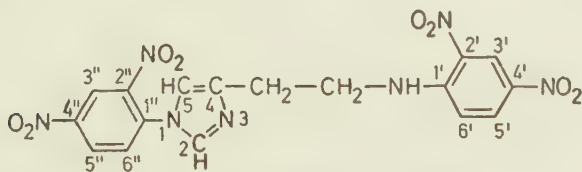
NMR-Spektrum von DNP-Histamin



Diskussion:

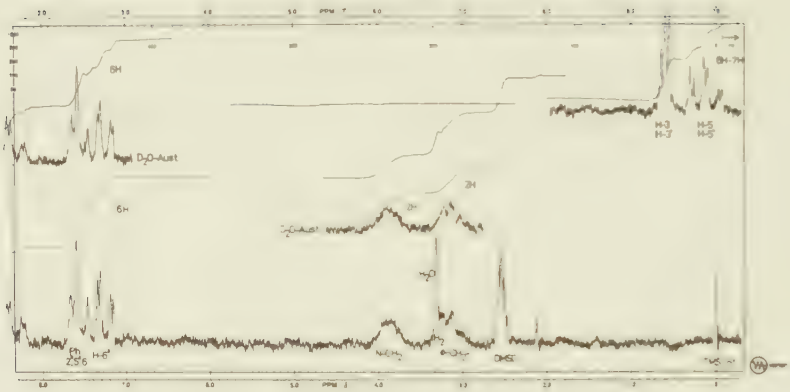
ppm	Protonen	Bezeichnung
9,23-8,55	4 H	NH, H-3', H-3'', H-5''
8,25	dd, $J_{3',5'} = 3 \text{ Hz}$, $J_{5',6'} = 9,5 \text{ Hz}$, 1 H	H - 5'
8,01	s, 1 H	CH=
7,70	d, $J = 9 \text{ Hz}$	H - 6''
7,36	s, 1 H	CH=
7,20	d, $J = 9,5 \text{ Hz}$, 1 H	H - 6'
3,80	m, 2 H	N-CH ₂
2,97	t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2 H	C-CH ₂

Struktur:



bis-Dinitrophenyl-Histamin MG 443, 35

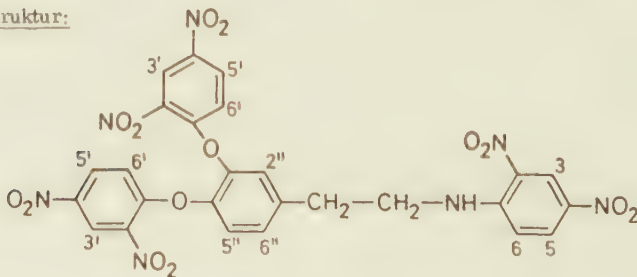
NMR-Spektrum von DNP-Dopamin



Diskussion:

ppm	Protonen	Bezeichnung
8,83-9,03	überlappende dd, 3 H	H - 3, H - 3', H - 3'
8,20-8,70	überlappende dd, 3 H	H - 5', H - 5', H - 5
7,15-7,75	6 H	H - 2'', H - 5'', H - 6'' H - 6', H - 6', H - 6
3,90	b, 12 Hz, 2 H	N-CH ₂
3,15	m, 2 H	Ø-CH ₂

Struktur:



tri-Dinitrophenyl-Dopamin MG 651, 55

3.4. IR-Überlagerungsspektren

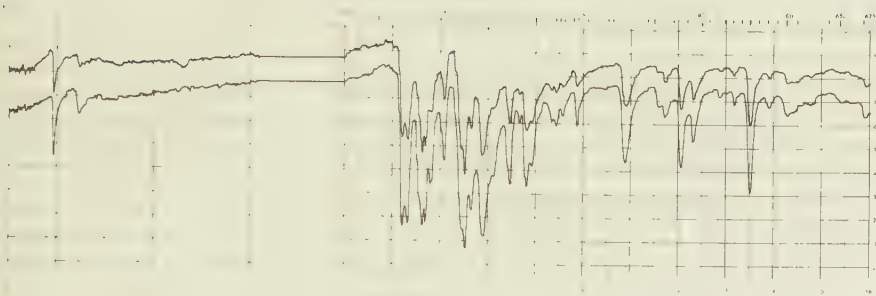
In den Fällen, in denen die Identität eines in einer Pflanze aufgefundenen Amins durch DC allein nicht geklärt werden kann, genügt es, das Amin nach Isolierung mit DNFB umzusetzen und sein IR-Spektrum mit dem eines authentischen DNP-Amins zu vergleichen. Wir isolierten mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie eine ausreichende Menge des Amins, rekristallisierten es und zeichneten die Überlagerungsspektren auf. In drei Drogen standen ausreichende Aminmengen zur Verfügung:

Das DNP-Aethanolamin isolierten wir aus *Crataegus oxyacantha*, das DNP-Tryptamin aus *Solanum lycopersicum* und das bis-DNP-Tyramin aus *Pelargonium reniforme*.

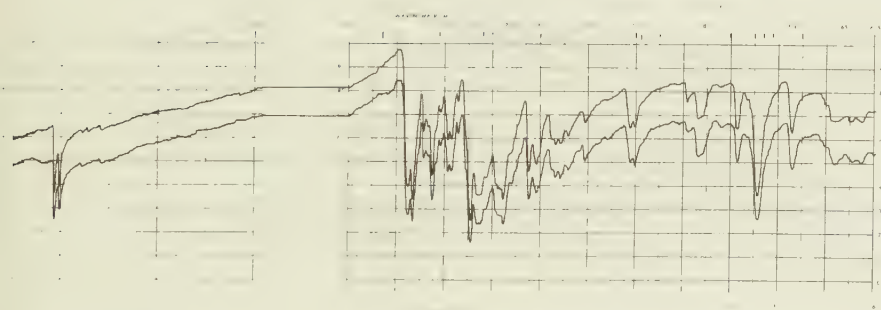
In den Abbildungen stellt die untere Kurve jeweils die von uns hergestellte DNP-Testsubstanz, die obere Kurve das aus der Droge gewonnene DNP-Amin-Umsetzungsprodukt dar.



Überlagerungsspektrum von DNP-Aethanolamin



Überlagerungsspektrum von bis-DNP-Tyramin



Überlagerungsspektrum von DNP-Tryptamin

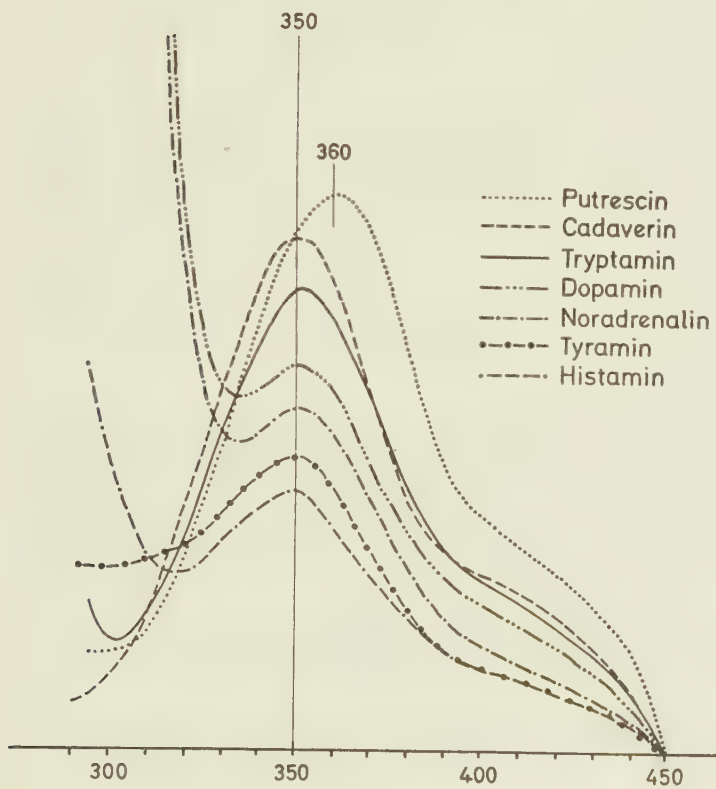
3.5. Die Absorptionsspektren der DNP-Amine

Über die Absorptionsspektren der Dinitrophenylamine finden sich in der Literatur nur unvollständige und zudem divergente Angaben^{66) 67)}. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich darin, daß die Absorptionskurven vom verwendeten Lösungsmittel abhängig sind^{70) 122)}.

Wir zeichnen die Absorptionskurven von allen Testsubstanzen auf. Die DNP-Amine wurden mit Ausnahme von bis-DNP-Putrescin in Methanol p.A. im Verhältnis 1:100 gelöst. Bis-DNP-Putrescin, das in Methanol nur schwer löslich ist, wird in 50 ml NN-Dimethylformamid aufgelöst und diese Lösung mit 50 ml Methanol versetzt. Gemessen wurde in Quarzküvetten ($d = 10$ mm) im Bereich von 450 nm bis 250 nm. Als Vergleichslösungen wurden Methanol p.A. bzw. NN-Dimethylformamid: Methanol = 50:50 eingesetzt. Das NN-Dimethylformamid eignet sich als Lösungsmittel, weil es, wie auch das Methanol, im untersuchten Bereich keine Eigenabsorption aufweist.

In der Abbildung sind die Absorptionskurven aller untersuchten DNP-Amine graphisch dargestellt (Bereich 300 bis 450 nm). Man sieht, daß bis-DNP-Putrescin, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, ein Maximum bei 360 nm aufweist, während alle anderen DNP-Amine ein gemeinsames Absorptionsmaximum bei 350 nm besitzen.

Die Absorptionsspektren der DNP-Amine



3.6. Aufstellung der Eichgeraden der DNP-Amine

Nachdem die Strukturen und damit die Molekulargewichte der DNP-Amine bekannt waren, konnten die Eichgeraden aufgestellt werden.

Zur Messung der Eichgeraden wurden gleichmolare Lösungen der DNP-Amine hergestellt:

4 μ Mol von jeder Testsubstanz werden in einem Meßkolben zu 100,0 ml Methanol gelöst. Eine Ausnahme macht wieder das bis-DNP-Putrescin, das nur in NN-Dimethylformamid : Methanol = 50:50 in Lösung geht. Weil die Kristalle der DNP-Amine sich im Methanol nur langsam lösen, lässt man sie zweckmäßigerweise unter Erwärmen in etwas Aceton auflösen, dampft das Aceton dann weitgehend ab und ergänzt mit Methanol auf 100,0 ml.

Von den so angefertigten gleichmolaren Eichlösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Dazu verwendeten wir jeweils 5 graduierte Zentrifugengläser, die mit einem Schliffstopfen ausgerüstet waren. In diese Gläser pipettiert man der Reihe nach 2, 4, 6, 8 und 10 ml von einer Eichlösung und ergänzt mit Methanol p.A. ad 10,0 ml.

Entsprechend enthalten die Gläser dann 0,08 ; 0,16 ; 0,24 ; 0,32 und 0,40 μ Mol des betreffenden Dinitrophenylamins.

Im Spektralphotometer wurden die Lösungen in Quarzküvetten (d = 10 mm) bei 350 nm bzw. 360 nm (für DNP-Putrescin) gegen Methanol als Leerwert gemessen.

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ berechnet sich nach der Gleichung:

$$\epsilon = \frac{E}{C} = \frac{\text{Extinktion}}{\text{Aminkonzentration in Mol/Liter}}$$

Den speziellen Extinktionskoeffizienten berechneten wir nach der Gleichung:

$$\epsilon' = \frac{E}{C'} = \frac{\text{Extinktion}}{\text{Aminkonzentration in Mol/Meßansatz}}$$

Für die Berechnung wurden jeweils 30 bis 40 Einzelbestimmungen aus zwei Ansätzen durchgeführt. Der spezielle Extinktionskoeffizient ϵ' errechnet sich als Mittelwert aus den Extinktionskoeffizienten der Einzelbestimmungen.

Die Tabellen mit den Meßwerten und die Fehlerrechnungen sind unter 7.3. im Experimentellen Teil aufgeführt.

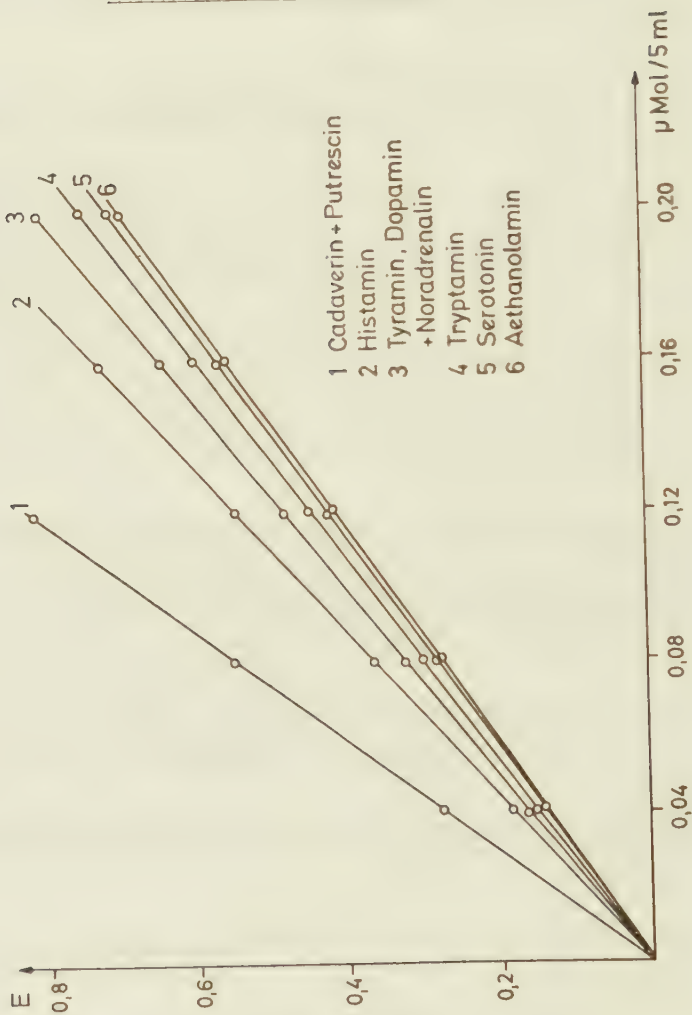
Die Eichgeraden aller untersuchter Dinitrophenylamine folgen streng dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Als identisch erwiesen sich die Eichgeraden gleichmolarer Lösungen von bis-DNP-Tyramin, tri-DNP-Dopamin und tri-DNP-Noradrenalin mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon' = 2,01$, sowie die Geraden von bis-DNP-Cadaverin und bis-DNP-Putrescin mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon' = 3,40$.

Für bis-DNP-Histamin erhielten wir $\epsilon' = 2,27$, für DNP-Aethanolamin $\epsilon' = 1,73$, für DNP-Tryptamin $\epsilon' = 1,88$ und für DNP-Serotonin $\epsilon' = 1,76$.

Die nachfolgende Graphik zeigt die Eichgeraden der Dinitrophenylamine.

Die Eichgeraden der DNP-Amine



3.7. Die dünnschichtchromatographische Trennung der DNP-Amine

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Amine müssen die Dinitrophenylamingemische chromatographisch aufgetrennt werden. Hier sind verschiedene Methoden der Papier- und Dünnschichtchromatographie vorgeschlagen worden.

Asatoor¹²¹⁾ trennte die 2,4-Dinitrophenylderivate der Amine durch aufsteigende Chromatographie auf Whatman NR 1 Papier, das mit 10%iger Paraffinlösung imprägniert war. Hartmann⁷²⁾ verwendete Schleicher und Schüll Papier NR 2043 bM, das zuvor mit einer 5%igen Paraffinlösung imprägniert wurde, in aufsteigender Chromatographie, mit dem Laufmittel Chloroform : Methanol : H₂O = 4 : 10 : 6. Kordts und Mitarb.¹⁵⁾ benutzten Papierstreifen derselben Qualität, die mit wasserfreier Ameisensäure getränkt und zwischen Fließpapier abgepresst worden waren. Als Laufmittel dienten diesen Autoren 3 Gemische: a) n-Hexan : Benzol = 80 : 20 ; b) Chloroform : n-Heptan : Ameisensäure (wasserfrei) : Essigsäure (wasserfrei) = 50 : 60 : 3 : 17 und c) Chloroform : n-Heptan : Ameisensäure : Essigsäureanhydrid 90% = 50 : 60 : 12 : 8.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Substanzflecken im UV-Licht markiert, die Flecken ausgeschnitten, mit Methanol eluiert und photometrisch bestimmt.

Zur Erhöhung des Kontrastes empfahl Franc¹²⁴⁾, die Papiere mit einer 0,005%igen wässrigen Fluoresceinlösung zu besprühen. Eine 0,04%ige Lösung von Phenanthren in n-Pentan hatte einen ähnlichen Effekt. Diese Lösungen ermöglichen die Nachweisgenauigkeit von 1 µg Derivat je Substanzfleck, es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß sie sich bei der quantitativen Auswertung auch störend auswirken können.

Zeman und Wirotama⁹¹⁾ trennten verschiedene DNP-Amine auf Kieselgel-Fertigplatten Merck mit Petrolaether : Aethylacetat = 4 : 1 und Ilert⁷³⁾ verwendete zur Trennung der Dinitrophenylderivate flüchtiger Amingemische Kieselgelplatten, die vor dem Gebrauch 2 Stunden bei 110°C aktiviert worden waren. Dazu wurden folgende Laufmittel vorgeschlagen:

a) Pentan : Essigsäureisoamylester : Ammoniak = 70 : 29 : 1 ; b) Benzol : Aethylacetat : Petrolaether = 97 : 2 : 1 und c) Pentan : Benzol : Triäthylamin = 45 : 45 : 10.

Die erwähnten Fließmittelsysteme wurden überprüft. Sie waren aber für unsere Zwecke nicht geeignet. Nach vielen Versuchen fanden wir die folgenden 4 Fließmittel, mit denen alle untersuchten Dinitrophenylamine auf Kieselgelplatten optimal getrennt werden.

Um die Trennung von DNP-Aminen mit ähnlichen Rf-Werten auf einer Platte zu erreichen, können die Systeme auch kombiniert angewendet werden, indem die Platten nacheinander in zwei verschiedenen Laufmitteln entwickelt werden. Als Sorbens eignen sich Kieselgel 60 F 254 Fertigplatten Merck.

Laufmittel 1

Toluol : Aethylacetat = 50 : 40

Laufmittel 2

Petrolaether : Aethylacetat = 20 : 80

Laufmittel 3

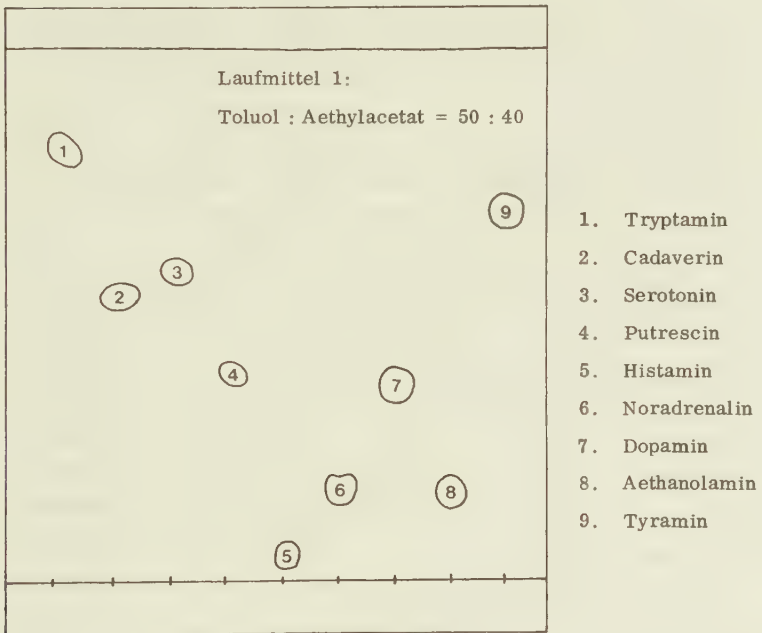
Toluol : Aethylacetat : 2-Butanon : Methanol = 50 : 40 : 25 : 5

Laufmittel 4

Toluol : Aethylacetat = 50 : 20

Das Laufmittel 1 wurde in unserem Arbeitskreis auch zu Trennung von Cumarinen verwendet¹¹⁶⁾.

Die Lage der DNP-Amine im Laufmittel 1 gibt die Abbildung des Chromatogramms wieder:

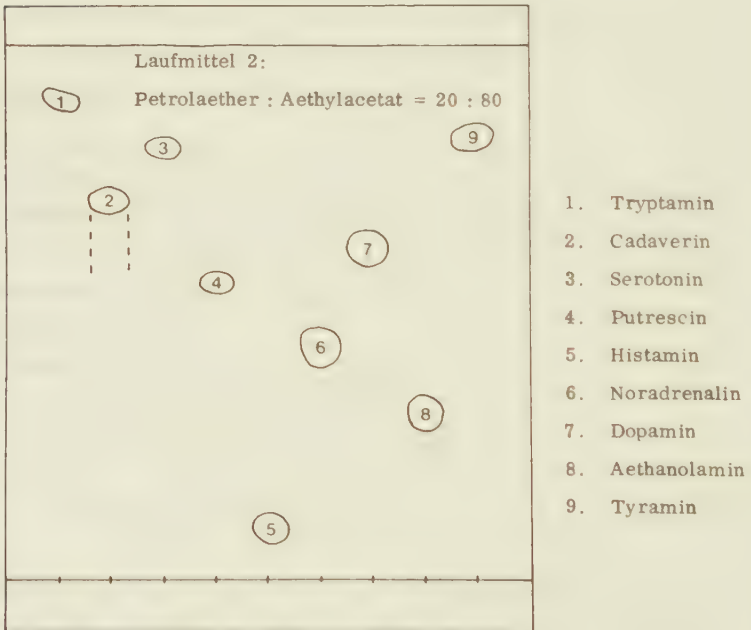


Wie aus der Zeichnung zu sehen ist, werden die Paare: DNP-Putrescin + DNP-Dopamin (R_f 0,39 + R_f 0,38) sowie DNP-Noradrenalin + DNP-Aethanolamin (R_f 0,17 + R_f 0,18) nicht deutlich getrennt. Außerdem bleibt das DNP-Histamin am Startpunkt sitzen (R_f 0,1).

Enthält ein Pflanzenextrakt oder ein Amingemisch eines der Paare, dann muß das Laufmittel 2 benutzt werden.

Hier werden DNP-Cadaverin, DNP-Serotonin und DNP-Tyramin deutlich getrennt (R_f 0,53 + R_f 0,59 + R_f 0,69). Das DNP-Tryptamin erreicht den R_f -Wert 8,2.

Abbildung des Chromatogramms der DNP-Amine im Laufmittel 2:

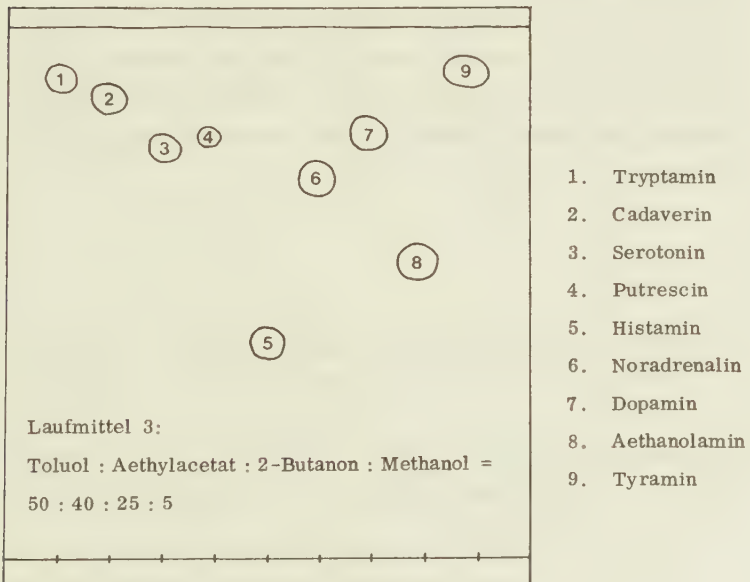


Wie aus dem Chromatogramm hervorgeht, wird in dem Laufmittel 2 das Paar DNP-Serotonin + DNP-Tyramin schlecht getrennt (Rf 0,82 + Rf 0,83). Getrennt werden die Paare DNP-Putrescin + DNP-Dopamin (Rf 0,55 - Rf 0,62) - bei der Zweifachtrennung verbessert sich das Trennergebnis noch - und DNP-Aethanolamin + DNP-Noradrenalin (Rf 0,3 + Rf 0,42). DNP-Histamin bleibt auch hier fast am Startpunkt sitzen (Rf 0,1).

Vergleicht man beide Fließmittelsysteme miteinander, dann wird erkennbar, daß sie sich gegenseitig gut ergänzen. Eine Ausnahme stellt nur das DNP-Histamin dar, welches in beiden Systemen nicht ausreichend transportiert wird.

Das Laufmittelsystem 3 ist eine Variante des Laufmittels 1. Durch Zusatz von 2-Butanon und Methanol wird die Elutionswirkung¹²⁴⁾ verstärkt.

Abbildung des Chromatogramms der DNP-Amine im Laufmittel 3:



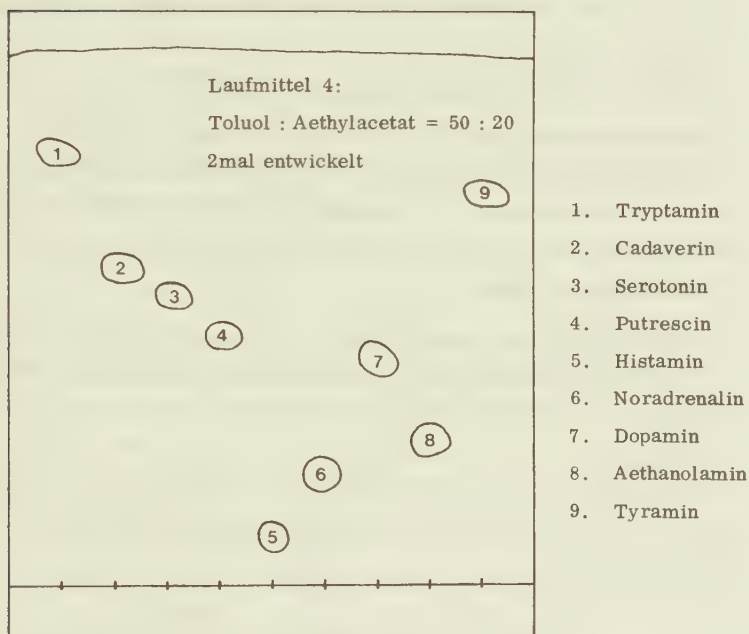
Das DNP-Histamin erreicht dadurch einen Rf-Wert von 0,41. DNP-Aethanolamin und DNP-Noradrenalin liegen bei Rf 0,57 - 0,71, während sich die höher liegenden Verbindungen in diesem Laufmittel naturgemäß stärker zur Front hin zusammenschieben.

DNP-Cadaverin, das in den Laufmitteln 1 und 2 manchmal zum "tailing" neigt - was für die quantitative Auswertung sehr störend ist und ungenaue Werte produziert - zeigt die Erscheinung in diesem Laufmittel normalerweise nicht. Es erreicht den Rf-Wert 0,82.

Die beschriebenen 3 Fließmittel trennen alle untersuchten DNP-Amine und reichen in der Regel für die qualitative und präparative Chromatographie aus.

Da für die quantitative Bestimmung die Platten 2mal entwickelt werden müssen, kann es, besonders bei höherer Raumtemperatur vorkommen, daß sich die Substanzflecken im oberen Drittel der Platte stärker zusammenschieben. In diesem Fall erreicht man mit dem Laufmittel Toluol : Äthylacetat = 50 : 20 eine gleichmäßigere Verteilung der DNP-Amine über die ganze Platte. Histamin und Noradrenalin erreichen jedoch nur die Rf-Werte 0,08 und 0,18.

Abbildung des Chromatogramms der DNP-Amine im Laufmittel 4:



Ein Einfluß der Kammersättigung auf das Trennergebnis war bei keinem der Laufmittel festzustellen. Eine Kammersättigung ist daher nicht notwendig.

Dagegen verändern sich die R_f -Werte unter Temperatureinfluß erheblich. Alle Bestimmungen wurden deshalb in einem klimatisierten Raum durch-

geführt, dessen Temperatur konstant bei 20°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) gehalten wurde.

Nach jeweils zwei Bestimmungen sollten die Laufmittel erneuert werden.

Da zur quantitativen Auswertung alle Platten 2mal entwickelt werden, können je nach der Konstellation des DNP-Amingemisches die Fließmittel auch kombiniert werden.

Enthält eine Droge beispielsweise Tyramin, Aethanolamin und Histamin, dann entwickelt man zuerst im Laufmittel 1 und dann im Laufmittel 3.

Damit kann auch das Histamin auf derselben Platte bestimmt werden. Wenn die kombinierte Anwendung zur Trennung eines Amingemisches nicht möglich ist, muß eine Bestimmung auf getrennten Platten in verschiedenen Fließmitteln durchgeführt werden.

Identifiziert werden die Dinitrophenylamine anhand von mitchromatographierten Testsubstanzen. Die gelben Substanzflecken sind auf dem Chromatogramm mit dem bloßen Auge zu erkennen. Die Markierung der Flecken erfolgt aber unter dem UV-Licht bei 254 nm. Die Aminflecken heben sich durch die Fluoreszenzminderung deutlich von dem hell fluoreszierenden Untergrund ab. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa $1\text{ }\mu\text{g}$ Derivat je Substanzfleck.

3.8. Die Umsetzung kleiner Aminmengen mit DNFB

Nach Bräuninger⁷⁰⁾ gelten für die Umsetzung kleiner Aminmengen mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol folgende vier Kriterien:

1. Das Verhältnis von Aceton zu wässriger Lösung im Umsetzungsmedium muß etwa 1 : 1 betragen.
2. Die Umsetzung muß in möglichst konzentrierten Ansätzen durchgeführt werden.
3. Die Ansätze müssen zur vollständigen Umsetzung 40 Minuten bei 60°C gehalten werden.
4. Die Reaktionsgeschwindigkeiten und auch die Ausbeuten steigen mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration.

3.8.1. Reagenzien

Aus den Aminhydrochloridsubstanzen stellten wir Lösungen zur Umsetzung mit DNFB her. Jeweils 8 bis 16 mg des jeweiligen Aminhydrochlorids wurden in einem Meßkölbchen in 10,0 ml 0,01 N HCl gelöst. Diese Lösungen waren auch bei verschlossener Aufbewahrung im Kühlschrank nur wenige Tage haltbar und mußten deshalb vor jeder Bestimmung frisch angefertigt werden.

Neben diesen Aminhydrochloridlösungen wurden die entsprechenden Reaktionslösungen von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol und Natriumhydrogencarbonat hergestellt. Hartmann⁴⁶⁾ arbeitete dazu Vorschriften aus, die wir für unsere Zwecke abwandelten:

Die acetonische DNFB-Lösung enthält 30 Tropfen DNFB, entsprechend 5 mMol, die in einem Meßkolben mit 100,0 ml Aceton gelöst werden. Dies entspricht einer Menge von 50 μMol in einem Milliliter.

Die Pufferlösung wurde durch Lösen von 840 mg Natriumhydrogencarbonat in einem Meßkolben von 100,0 ml destilliertem Wasser hergestellt. 0,5 ml dieser Lösung enthalten 50 μMol NaHCO_3 .

Da sich überschüssiges DNFB ebenfalls ausschütteln lässt und so die Auswertung stören kann, wird es durch Umsetzen mit Glycin entfernt⁶⁹⁾.

Diese Lösung besteht aus 374,4 mg Glycin und 420 mg NaHCO_3 , die in 100,0 ml destilliertem Wasser in einem Meßkolben gelöst werden. Die eingewogenen Mengen entsprechen 5 mMol Glycin und 5 mMol Natriumhydrogencarbonat.

3.8.2. Durchführung der Reaktion

Zur Umsetzung wurden je 0,5 ml Aminlösung, die 0,4 bzw. 0,8 mg Aminhydrochlorid enthielten, 1 ml DNFB-Lösung und 0,5 ml NaHCO_3 Pufferlösung in mit einem Glasstopfen verschließbare Zentrifugengläser von 10 ml Inhalt pipettiert.

Die Reaktionsgemische wurden in ein Wasserbad von 60°C gestellt und unter gelegentlichem Umschütteln 40 Minuten darin belassen. Es ist darauf zu achten, daß die Glasstopfen locker aufgesetzt werden, weil die acetonische Lösung leicht verspritzen kann.

Um das überschüssige DNFB zu binden, gibt man anschließend jeweils 0,2 ml des Glycin- NaHCO_3 -Puffers dazu und belasst die Gläser für weitere 20 Minuten in dem Wasserbad.

Je nach Konzentration fallen die Amine, mit Ausnahme von DNP-Aethanolamin, schon bei der Umsetzung teilweise aus.

Durch Versuche fanden wir heraus, daß sich die Dinitrophenylamine mit einem Gemisch von Aceton : Aether = 2 : 3 quantitativ ausschütteln lassen.

Eine Ausnahme gilt allerdings für das bis-DNP-Putrescin, das in Aceton : Aether nur zu einem geringen Teil ausschüttelbar ist. Versucht man das DNP-Putrescin mit veränderten Mischungsverhältnissen oder mit anderen Lösungsmitteln zu extrahieren, so scheitert die Bestimmung zuletzt daran, daß die Substanz sich auch in Methanol kaum löst und nach dem Chromatographieren aus der Kieselgelschicht nicht quantitativ extrahiert wird. Eine quantitative Bestimmung von DNP-Putrescin ist darum mit der vorliegenden Methode nicht möglich.

Die DNP-Aminextrakte werden am Rotationsverdampfer bei 45°C zur Trockene eingeeengt und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur in 2,0 ml Aceton gelöst.

Von diesen Lösungen werden jeweils 20 und 40 µl zur Chromatographie verwendet. Das Auftragen der Lösungen auf die Dünnschichtplatte erfolgt mit Blutzuckerpipetten oder mechanisch mit dem "Unimetrics Multispotter".

Chromatographiert wird auf Kieselgel 60 F 254 Platten Merck im Laufmittel 1 (Toluol : Aethylacetat = 50 : 40). Eine Ausnahme stellen das bis-DNP-Histamin und das DNP-Cadaverin dar, die im Laufmittel 3 entwickelt werden müssen.

3.8.3. Die quantitative Bestimmung

Nach dem Entwickeln werden die Substanzflecken unter dem UV-Licht mit Bleistift markiert. Mit einem kleinen Spatel schabt man die Kieselgelschichten sorgfältig ab und befördert sie durch einen Glastrichter in verschiedene Reagenzgläser.

Zum Vergleich wird ein ebenso großer, substanzfreier Fleck auf der Kieselgelplatte ausgeschabt und in der gleichen Weise behandelt. In jedes Glas gibt man 3 Glaskugeln und pipettiert dazu 5,0 ml Methanol. Auf dem "Whirli Mixer" wird jedes Glas 2mal 20 Sekunden geschüttelt. Dann werden die Suspensionen zur Abtrennung des Kieselgels in Zentrifugengläser gefüllt und 10 Minuten bei 3000 U/Min. geschleudert.

Die erhaltenen, klaren, gelblichen, methanolischen DNP-Aminlösungen werden zur Messung direkt in die Küvetten dekantiert. Wir verwendeten, wie auch bei der Aufstellung der Eichgeraden beschrieben, Quarzküvetten ($d = 10 \text{ mm}$). Als Blindwert diente die aus der substanzfreien Zone extrahierte methanolische Lösung. Die Leerextrakte zeigen im Meßbereich der DNP-Amine bei 350 nm eine nur geringe und konstante Absorption ($E = 0,002 - 0,003 \text{ pro cm}^2 \text{ Kieselgelfläche}$)⁷³⁾.

3.9. Berechnung des Amingehaltes

Aus den am Spektralphotometer gemessenen Extinktionen kann anhand der Eichkurve die Konzentration des DNP-Amins in μMol pro Meßansatz (5 ml) abgelesen werden.

Rechnerisch erhält man das gleiche Ergebnis, wenn man aus der Formel für den speziellen Extinktionskoeffizienten ϵ'

$$\epsilon' = \frac{E}{C'} \quad \text{die Konzentration } C' = \frac{E}{\epsilon'} \left[\mu\text{Mol/Meßansatz} \right]$$

berechnet.

Zur Kontrolle der quantitativen Bestimmungen müssen die Ergebnisse aber auf die eingesetzten Mengen an Aminhydrochloriden zurückgerechnet werden.

Aus C' berechnet sich der Gehalt an Aminhydrochlorid pro Meßansatz nach der Formel:

$$C_{\text{Amin HCl}} = \frac{C' \cdot \text{MG}_{\text{Amin HCl}}}{\text{MG}_{\text{DNP Amin}}} \left[\mu\text{Mol/Meßansatz} \right]$$

Umrechnung auf den Gesamtgehalt

Die Dinitrophenylamine werden nach der Umsetzung jeweils in 2,0 ml Aceton gelöst. In der Regel werden von dieser Lösung 20 μl zur Chromatographie entnommen:

20 μl = 0,02 ml, also muß das Ergebnis mit 100 multipliziert werden.

Zur Umrechnung auf den Gesamtgehalt an Aminhydrochlorid, ausgedrückt in Gramm, wird das Ergebnis mit dem Gewicht eines μ Mols des betreffenden Aminhydrochlorids multipliziert.

Die gesamte Formel lautet dann:

$$C_{\text{Amin HCl}} = \frac{C' \cdot \text{MG}_{\text{Amin HCl}}}{\text{MG}_{\text{DNP Amin}}} \cdot \text{MG}_{\text{Amin HCl}} \cdot 10^{-4}$$

Werden 40 μ l der Aminlösung zur Chromatographie verwendet, dann muß das Ergebnis noch durch 2 dividiert werden.

3.10. Analysen zur quantitativen Bestimmung

Von allen Aminhydrochloriden stellten wir jeweils drei Lösungen her, die 8 oder 16 mg Substanz enthielten. 0,5 ml davon setzten wir mit DNFB um und führten eine quantitative Bestimmung durch.

In der folgenden Aufstellung sind die Mittelwerte der Bestimmungen wiedergegeben. Die Einzelergebnisse sind im Experimentellen Teil unter 7.5.5. aufgeführt.

	gefunden (mg)	% der eingesetzten Menge
DNP-Aethanolamin	0,8073	100,9
DNP-Tryptamin	0,7979	99,7
bis-DNP-Cadaverin	0,3966	99,4
bis-DNP-Tyramin	0,6793	84,9
bis-DNP-Histamin	0,6727	84,1
tri-DNP-Dopamin	0,5625	70,3
tri-DNP-Noradrenalin	0,5647	70,9

3.10.1. Diskussion der Ergebnisse

Bei der Auswertung der Ergebnisse erhielten wir für DNP-Aethanolamin, bis-DNP-Cadaverin und DNP-Tryptamin eine 100%ige Umsetzung. Die anderen Aminhydrochloride reagierten dagegen nicht vollständig mit DNFB.

Eine 85%ige Umsetzung fanden wir bei bis-DNP-Tyramin und bis-DNP-Histamin, während sich tri-DNP-Dopamin und tri-DNP-Noradrenalin nur zu 70% umsetzten.

Daraus geht hervor, daß man bei allen monosubstituierten Aminen und aliphatischen Diaminen ein 100%iges Umsetzungsergebnis erhält. Bei den zweifach substituierten aromatischen Aminen ist das Umsetzungsergebnis 85% des Sollwertes und bei den dreifach substituierten aromatischen Aminen nur 70% des Sollwertes. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Lücke und van Opstall^{125) 126)} bei Umsetzungen mit 2,4-Dinitrochlorbenzol beschrieben.

Für die unvollständige Reaktion der phenolischen Aminhydrochloride mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol gibt es verschiedene mögliche Erklärungen:

1. Durch die sperrige Struktur der entstehenden Dinitrophenylamine könnten die freien Elektronenpaare der Stickstoff- und Sauerstoffatome der Amine teilweise abgeschirmt werden und daher der nukleophile Angriff verlangsamt, bzw. teilweise verhindert werden.
2. Die in ortho-Stellung zum Fluoratom stehende Nitrogruppe des 1-Fluor-2,4-dinitrobenzols, die bei erhöhter Temperatur frei drehbar ist, behindert durch ihren negativen Sauerstoff den nukleophilen Angriff.

Eigene Versuche zeigten, daß durch Verlängern der Reaktionszeiten das Umsetzungsergebnis nicht verbessert werden konnte. Es waren auch keine Zwischenprodukte, wie Mono- und di-Substitutionsprodukte nachweisbar.

Da die Umsetzungen jedoch einer Regel folgen und die Meßergebnisse sehr gut reproduzierbar sind, können die prozentualen Ausbeuten mit der Formel

$$x = \frac{\text{Wert in g} \cdot 100}{85 \text{ bzw. } 70}$$

auf 100% hochgerechnet werden. Als Endergebnis erhält man wieder den wahren Ausgangswert des Aminhydrochlorids in Gramm.

In Tabelle 7.5.6. auf Seite 131 sind die Umrechnungsformeln für alle bearbeiteten Dinitrophenylamine angegeben.

3.10.2. Zur Frage der irreversiblen Adsorption an Kieselgel

Die Eichgeraden der DNP-Amine sind direkt aus den verdünnten Lösungen bestimmt worden. Der Bestimmung aus den Aminlösungen und den Drogenextrakten geht aber eine dünn-schichtchromatographische Auftrennung und Elution aus den Platten voraus. Es muß deshalb mit einer teilweisen irreversiblen Adsorption der Aminverbindungen an das Kieselgel gerechnet werden.

Wir haben daher Parallelversuche mit Stammlösungen bekannter Konzentration durchgeführt, von denen jeweils gleiche Volumina einmal direkt, einmal nach DC-Trennung auf Kieselgel 60 F 254 Platten quantitativ bestimmt wurden.

Bei sorgfältiger Extraktion der Kieselgelschichten waren die Verluste mit 2% ($\pm 1\%$) minimal. Diese Resultate liegen innerhalb der für solche Bestimmungen üblichen Fehlergrenze von $\pm 5\%$ und können vernachlässigt werden, wie die Ergebnisse unter 7.5.5. auch beweisen. Das Aufstellen zusätzlicher Eichgeraden oder das Mitlaufenlassen eines Standards erübrigt sich.

4.0. Bestimmungen aus dem Pflanzenmaterial

4.1. Extraktion der biogenen Amine

Die mit Reinsubstanzen bzw. Substanzgemischen durchgeführten Bestimmungen müssen auf Pflanzenextrakte, die mehr oder minder große Mengen an Begleitstoffen enthalten, übertragen werden. Wir arbeiteten hierfür folgendes Verfahren aus:

0,5 bis 2,0 Gramm getrocknete, gemahlene oder gefriergetrocknete Droge werden auf dem Dampfbad mit 3mal 50 ml 0,01 N HCl extrahiert. Nach dem Erkalten werden die Extrakte vereinigt und zentrifugiert. Dadurch wird der größte Teil der Ballaststoffe ausgefällt. Die klaren, aminhaltigen Extrakte werden filtriert und mit dem Alkalipuffer auf einen pH von 6 bis 6,5 gebracht.

Bei Bestimmungen aus frischem Drogenmaterial werden lyophilisierte Extrakte verwendet. Die eingesetzten Pflanzenmengen liegen zwischen 25,0 Gramm bei Kräutern und Blüten und 50,0 bis 75,0 Gramm bei Früchten und Wurzeln. Von dem Lyophilisat verwendeten wir 1,0 bis 2,0 Gramm zur Bestimmung der biogenen Amine. Es wird in 0,01 N HCl über Wasserdampf gelöst, abgekühlt und mit Alkalipuffer auf pH 6 bis 6,5 gebracht.

Sodann werden die Extrakte in gleicher Weise weiterbehandelt:

Am Rotationsverdampfer wird die Lösung auf 30 bis 50 ml eingeeengt. Sie sollte dann einen pH von etwa 8 haben. Zur Abtrennung der restlichen Ballaststoffe verwendeten wir ein spezielles Adsorptionsverfahren:

Eine Glasfritte mit der Porengröße G 4, die einen Durchmesser von 2 cm und einen mindestens 15 cm langen Hals hat, wird auf eine Saugflasche gesetzt und bei leichtem Unterdruck zunächst mit einer Suspension eines nach einem speziellen Verfahren zubereiteten Polyamids etwa 1,5 cm hoch gefüllt (Ultramid K 228 BM 2 BASF)¹²⁷⁾. Auf die feste Polyamidschicht gießt man mittels eines Glasstabes vorsichtig Sephadex LH 20 Gel, das man, ebenso wie das Polyamid, mindestens 24 Stunden in Alkohol : Wasser = 1 : 2 vorquellen ließ.

Die Sephadex-Schicht sollte je nach eingesetzter Drogenmenge zwischen 6 und 10 cm hoch sein.

Die kombinierte Säule wird mit etwa 30 ml einer Mischung aus Alkohol : 0,01 N HCl : H₂O = 1 : 1 : 1 gespült, bevor der Pflanzenextrakt aufgetragen wird.

Dieser wird mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 80 Tropfen pro Minute durch die Säule gesaugt und mit 90 ml Alkohol : 0,01 N HCl : H₂O = 1 : 1 : 1 nachgewaschen.

Das Eluat hat dann einen pH von etwa 6,5. Es wird in einen 500 ml Schliffkolben gefüllt und am Rotationsverdampfer auf 10 ml eingeeengt.

Zur Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol muß der Extrakt auf 0,5 bis 1,0 ml konzentriert werden, weil die Umsetzungsgeschwindigkeit und die Ausbeute stark von der Konzentration des Ansatzes abhängig sind⁷⁰⁾. Für diesen Ansatz ist der 500 ml Kolben zu groß. Deshalb wird der auf 10 ml eingeeengte Pflanzenextrakt mit 20 ml destilliertem Wasser und 10 ml Alkohol in einen 100 ml Schliffkolben gespült.

In dem 100 ml Kolben wird die Lösung bis fast zur Trockene einrotiert. Der Zusatz von 10 ml Alkohol dient dazu, Verluste durch Verspritzen des wässrigen Auszuges zu vermeiden.

4.2. Die Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

Der bis fast zur Trockene einrotierte aminhaltige Extrakt wird mit 0,01 N HCl zu 1 ml ergänzt. Dazu pipettiert man 2,0 ml der acetonischen DNFB-Lösung, die 100 μ Mol 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol in Aceton enthält und 1,0 ml Natriumhydrogencarbonatpuffer, entsprechend 100 μ Mol NaHCO_3 .

Der Kolben mit der Reaktionslösung wird mit einem Glasstopfen locker verschlossen und zur Umsetzung 40 Minuten in ein Wasserbad von 60°C gestellt. Von Zeit zu Zeit wird vorsichtig geschüttelt.

Zeigt sich nach wenigen Minuten keine kräftige Gelbfärbung, deutet dies auf einen zu sauren pH des Aminextraktes hin. In diesem Fall kann durch Abpuffern mit einer Spatelspitze NaHCO_3 (= 5 bis 7 mg) die Umsetzung in Gang gebracht werden. Um das überschüssige Dinitrofluorbenzol zu binden, werden anschließend noch 0,4 ml der Glycin- NaHCO_3 -Pufferlösung zugegeben, die 20 μ Mol Glycin und 20 μ Mol NaHCO_3 enthält.

Die Lösung belässt man weitere 20 Minuten in dem Wasserbad. Nach dem Abkühlen werden die DNP-Amine mit einem Gemisch aus Aceton : Aether im Verhältnis 2 : 3 quantitativ ausgeschüttelt.

Dies geschieht am besten, indem man mit dem Aceton - Aether-Gemisch die umgesetzte Reaktionslösung in ein mit einem Schliffstopfen verschließbares, 10 ml großes Zentrifugenglas spült, weil sich dann die Phasen besser trennen lassen.

Zur schnellen Entmischung der Phasen werden nach jedem Ausschütteln die Gläser bei 2500 U/Min. kurz zentrifugiert und die klaren Aceton-Aetherphasen, die die DNP-Amine enthalten, abgehoben und in einen 50 ml Schliffstehkolben pipettiert.

Die Aceton-Aetherphasen werden am Rotationsverdampfer bei 45°C vor-

sichtig zur Trockene eingengt. Trübt sich die Lösung beim Einrotieren, setzt man noch einige Milliliter Aceton zu, die ein Verspritzen der DNP-Amine verhindern.

In dem Kolben sind die DNP-Amine quantitativ enthalten. Sie werden in 2,00 ml Aceton p.A. gelöst. Gelegentlich sind die Amin-Extrakte durch die anorganischen Salze, die mitausgeschüttelt wurden, leicht getrübt. Sie werden dann in einem verschließbaren Zentrifugenglas 5 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert.

Die klare Lösung wird in einen 50 ml Schliffkolben dekantiert und chromatographiert.

4.3. DC-Auftrennung und Spektralphotometrie

Die Dünnschichtchromatographie wird auf Kieselgel 60 F 254 Fertigplatten durchgeführt.

Von der acetonischen Dinitrophenylaminlösung werden in der Regel 20 oder 40 μ l punktförmig aufgetragen. Größere Mengen der Extrakte werden strichförmig aufgetragen. Das Auftragen erfolgte wieder mit dem "Multispotter" oder mit Blutzuckerpipetten.

Die Platten werden wie beschrieben zweimal etwa 11 bis 12 cm hoch entwickelt und nach jedem Entwickeln mit Warmluft getrocknet. Die Identifizierung der DNP-Amine erfolgt anhand von mitchromatographierten Testsubstanzen. Die Auftragsmenge wählt man gemäß der mit dem Auge wahrnehmbaren Intensität der Aminflecken so, daß die Extinktion am Spektralphotometer im Bereich zwischen 0,15 und 0,6 entsprechend 0,08 - 0,32 μ Mol DNP-Amin pro Bestimmungsansatz liegt.

Von jedem DNP-Aminextrakt machten wir gewöhnlich vier Parallelbestimmungen. Auf der Kieselgelplatte werden die vier Punkte und die Vergleichssubstanzen nebeneinander aufgetragen und in dem jeweils passenden Fließmittel entwickelt.

Die Substanzzonen werden unter dem UV-Licht markiert, mit einem feinen Spatel vorsichtig abgeschabt, in Reagenzgläser überführt und mit 5,0 ml Methanol quantitativ eluiert. Als Blindwert wird eine entsprechend große aminfreie Kieselgelzone extrahiert.

Zum Abtrennen des Kieselgels werden die Suspensionen in Zentrifugengläser gefüllt und 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird direkt in die Küvetten dekantiert und gegen den Blindwert im Spektralphotometer bei 350 nm gemessen.

4.4. Fällung der störenden Ballaststoffe mit Aceton

Wir versuchten, die biogenen Amine aus Pflanzen und Drogen auch nach einer modifizierten Methode zu isolieren. Hierbei werden die Ballaststoffe mit Aceton ausgefällt:

Das Untersuchungsgut wird wie beschrieben quantitativ extrahiert, mit Alkalipuffer versetzt und auf 50 ml Volumen eingeeengt. Man versetzt den Extrakt mit 300 ml Aceton (6 Vol) und schüttelt das Gemisch 2 Stunden lang, lässt über Nacht stehen und filtriert den klaren gelbfarbenen Acetonextrakt durch ein Glasfrittenfilter G 4. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer bei 45⁰ C bis fast zur Trockene eingeeengt und mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol umgesetzt.

Bei der Acetonfällung treten aber so starke Adsorptionsverluste auf, daß Noradrenalin und Dopamin überhaupt nicht, Histamin, Cadaverin und Aethanolamin nur noch zu 50% nachweisbar waren, wenn eine Aminhydrochloridlösung bekannter Konzentration einem Pflanzenextrakt zugegeben worden war. Tyramin und Tryptamin wurden dagegen quantitativ gefunden.

4.5. Abtrennen der flüchtigen Amine

Bei der Untersuchung der Drogen auf nichtflüchtige Amine können unter Umständen die flüchtigen Amine die chromatographische Auftrennung durch Überlappung stören. In diesem Falle müssen sie abgetrennt werden.

Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis flüchtiger Amine in Pflanzen sind von Steiner, Stein von Kamienski und Hartmann⁷²⁻⁷⁵⁾ publiziert worden:

Die Amine werden durch Wasserdampfdestillation isoliert. Der Aminrohextrakt, mit 0,01 N HCl hergestellt, wird mit Alkalipuffer alkalisch gemacht und dann destilliert. Die Amine können in einer Vorlage mit 0,1 N Salzsäure quantitativ aufgefangen werden und nach dem Einrotieren mit Dinitrofluorbenzol umgesetzt und bestimmt werden.

Wir schlagen folgende Methode vor: Die Wasserdampfdestillation wird durch die Destillation am Rotationsverdampfer ersetzt. Bei quantitativem Arbeiten muß zwischen Vorlage und Wasserstrahlpumpe zusätzlich eine mit 0,1 N Salzsäure beschickte Waschflasche geschaltet werden¹³⁾.

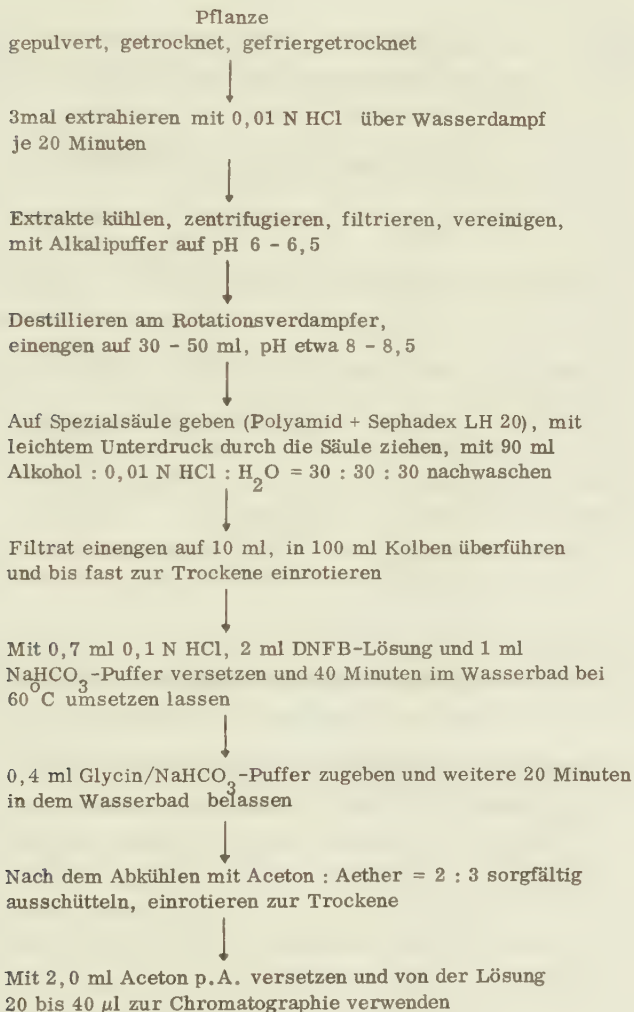
Der Aminrohextrakt wird mit Alkalipuffer auf pH 9, bei Anwesenheit von Noradrenalin und Dopamin wegen der Oxydationsempfindlichkeit dieser Substanzen nur auf pH 7 gebracht und solange bei 45°C destilliert, bis in

dem Kolben noch 50 ml Extrakt zurückbleiben. Während der Destillation erhöht sich der pH auf 11 bzw. 9. Ein pH von 9 ist für Noradrenalin und Dopamin gerade noch zumutbar, darüber hinaus zersetzen sich beide Amine. Ob sich bei einem pH von 9 schon alle flüchtigen Amine quantitativ entfernen lassen, ist nicht sicher.

Vor dem Auftragen auf die kombinierte Säule muß der Extrakt mit 0,1 N HCl neutralisiert werden. Die weiteren Arbeitsgänge sind beschrieben worden.

Auf der folgenden Seite ist die Extraktion der nichtflüchtigen Amine in einem zusammenhängenden Schema dargestellt.

4.6. Extraktionsschema zur Anreicherung von Aminen



4.7. Beleganalysen zur Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode

Nach Ausarbeitung der in den vorausgegangenen Kapiteln beschriebenen Bestimmungsmethode führten wir eine größere Zahl von Untersuchungen durch, um die Leistungsfähigkeit der Methode zu prüfen.

Zum Beleg werden nachfolgend einige Beispiele zitiert:

4.7.1. Bestimmung von Aminen in einer Modellmischung

Für die Bestimmungen werden je 8 mg der Aminhydrochloride zu Zweier- und Dreiergemischen zusammengefügt und zu 10,0 ml mit 0,01 N HCl gelöst. Von diesen Stammlösungen werden 0,5 oder 1,0 ml mit einer Pipette entnommen und mit 50 ml 0,01 N HCl gemischt. Diese Lösung wird so behandelt wie ein Aminrohextrakt aus biologischem Material.

Folgende Gemische werden untersucht:

1. Aethanolamin + Cadaverin
2. Noradrenalin + Dopamin
3. Histamin + Cadaverin
4. Tyramin + Tryptamin + Aethanolamin
5. Cadaverin + Aethanolamin + Histamin

Das Ergebnis der quantitativen Bestimmung ist der Tabelle zu entnehmen. Die prozentualen Werte sind auf den wirklichen Gehalt hochgerechnet. Die Werte sind gut reproduzierbar. Die Streuung ist nicht größer als $\pm 5\%$.

Tabelle: Beleganalysen Aminhydrochloridgemische

Gemisch	Amin HCl	prozentuale Ausbeuten				mittlere Ausbeuten in %
1	Aethanolamin	101,7	102,9	101,6	102,9	102,28
	Cadaverin	99,6	102,8	96,0	98,6	99,25
2	Noradrenalin	101,9	101,3	101,3	103,5	102,0
	Dopamin	101,0	101,0	97,1	99,5	99,65
3	Histamin	98,8	100,0	97,0	98,3	98,52
	Cadaverin	98,6	99,1	98,1	101,2	99,25
4	Tyramin	101,0	101,0	97,8	96,8	99,15
	Tryptamin	98,5	102,5	105,6	103,1	102,4
	Aethanolamin	96,8	101,7	100,1	99,8	99,6
5	Cadaverin	99,1	97,6	98,1	102,3	99,3
	Aethanolamin	101,0	101,7	101,0	102,6	101,6
	Histamin	97,0	100,0	98,0	98,8	98,5

4.7.2. Zusatz von Aminen zu einem aminfreien Pflanzenextrakt

Um zu prüfen, ob und wie weit die Pflanzenbegleitstoffe die quantitative Extraktion und Bestimmung beeinflussen, setzten wir einer aminfreien Droge, Radix Maytenus heterophyllus, Aminhydrochloridmischungen bekannter Konzentration zu und bestimmten diese nach Extraktion und Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol.

Mischung 1 enthielt je 0,5 mg Cadaverin, Dopamin und Noradrenalin, Mischung 2 bestand aus je 0,5 mg Histamin, Tryptamin und Aethanolamin.

In der nächsten Tabelle sind die Ergebnisse aufgeführt. Von jedem Gemisch wurden 6 Proben gemessen. Mischung 1 wurde im Laufmittel 4 entwickelt, für die Mischung 2 verwendeten wir die Laufmittel 1 und 3.

Tabelle: Maytenus + Histamin + Tryptamin + Aethanolamin

	μ l	E	Gehalt gefunden (mg)	Gehalt berechnet (mg)	% der eingesetzten Menge
Aethanolamin	20	0,199	0,4818		96,35
	20	0,202	0,4890		97,8
	20	0,210	0,5084		101,68
	40	0,410	0,4963		99,26
	40	0,440	0,5326		106,52
	20	0,219	0,5302		106,04 $\emptyset = 101,27$
Tryptamin	40	0,160	0,5044		100,88
	40	0,163	0,5138		102,76
	40	0,155	0,4886		97,72
	40	0,168	0,5296		105,92
	40	0,158	0,4981		99,65
	40	0,164	0,5170		103,40 $\emptyset = 101,7$
Histamin	40	0,229	0,3856	0,4536	90,72
	40	0,235	0,3957	0,4655	93,1
	40	0,243	0,4091	0,4812	96,24
	40	0,245	0,4125	0,4852	97,04
	40	0,246	0,4142	0,4872	97,44
	40	0,243	0,4091	0,4812	96,24 $\emptyset = 95,13$

Tabelle : Maytenus + Cadaverin + Dopamin + Noradrenalin

	μ l	E	Gehalt gefunden (mg)	Gehalt berechnet (mg)	% der eingesetzten Menge
Cadaverin	40	0,465	0,4827		96,54
	40	0,430	0,4463		89,26
	20	0,230	0,4775		95,5
	20	0,235	0,4879		97,58
	20	0,255	0,5294		105,88
	20	0,245	0,5086		101,72 $\varnothing = 97,75$
Noradrenalin1	40	0,220	0,3467	0,4952	99,04
	40	0,210	0,3309	0,4727	94,54
	40	0,228	0,3593	0,5132	102,65
	40	0,238	0,3750	0,5357	107,14
	40	0,230	0,3624	0,5177	103,54
	40	0,223	0,3514	0,5020	100,4 $\varnothing = 101,2$
Dopamin	20	0,135	0,3707	0,5295	105,9
	20	0,120	0,3295	0,4707	94,14
	20	0,115	0,3157	0,4510	90,20
	20	0,125	0,3432	0,4902	98,04
	40	0,255	0,3501	0,5001	100,02
	40	0,250	0,3432	0,4902	98,04 $\varnothing = 97,72$

4.7.3. Zusatz von Tyramin zu einem aminhaltigen Extrakt

Aus Radix Pelargonium reniforme bestimmten wir den Tyramingehalt. 2,5 g des Drogenpulvers wurden dazu verwendet. Gleichzeitig wurde noch ein Parallelansatz aufbereitet, dem zusätzlich 0,5 mg Tyraminhydrochlorid in einer Lösung von 0,01 N HCl zugesetzt waren (0,5 ml einer Lösung von 10 mg Tyraminhydrochlorid in 10,0 ml 0,01 N HCl).

Der Differenzbetrag aus den Mittelwerten der beiden Ansätze ergibt die Menge an zugesetztem Tyraminhydrochlorid. Die Ergebnisse sind in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle: Pelargonium reniforme + Tyramin

	E	Gehalt (g)	
Tyramin	0,895	0,0033649	
	0,845	0,0031769	
	0,860	0,0032332	
	0,868	0,0032634	$\bar{\phi} = 0,0032596$
			Differenz: 0,0005141
Tyramin	1,019	0,0038311	
+ Tyramin HCl	1,008	0,0037896	
	0,998	0,0037522	
	0,990	0,0037221	$\bar{\phi} = 0,0037737$
			= 102,82%

Alle Tabellen zeigen, daß die eingesetzten Aminmengen wiedergefunden werden. Die Mittelwerte aus je fünf Bestimmungen liegen innerhalb der Toleranz von $\pm 5\%$.

Da Streuungen von Werten vorkommen können, die über diese Toleranz hinausgehen, sollte man für eine Bestimmung immer den Mittelwert aus 3 bis 5 Messungen heranziehen.

4.8. Untersuchungen an Drogen

Um einen Überblick über die in den Drogen vorkommenden Aminmengen zu erhalten, haben wir, basierend auf den Ergebnissen des Pflanzenscreenings, stichprobenartig einige der Drogen zur quantitativen Bestimmung ausgewählt. Bevorzugt wurden Drogen, über deren Amingehalt nach unserer Kenntnis bis heute nicht berichtet worden ist oder deren Amingehalt noch nicht bestimmt worden ist.

4.9.1. Tabelle: Untersuchungen an Drogen
(Gewichtsangaben in mg)

	Aethanolamin	Dopamin	Cadaverin	Tyramin	Tryptamin	Histamin
Limonium vulgare Kraut, getrocknet 5,0 g	0,044	(Spuren)	0,046	3,340	-	-
Pelargonium reniforme Wurzel, getrocknet 5,0 g (Südafrika, gesammelt)	0,1205	-	-	2,838	-	-
Pelargonium reniforme Wurzel, getrocknet 5,0 g (Iso-Werke, Regensburg)	0,1263	-	-	6,508	-	-
Crataegus oxyacantha Blüten, getrocknet 5,0 g	0,1612	-	-	-	-	-
Brunfelsia grandiflora Kraut, Frischdroge 25,0 g	0,2784	-	-	0,451	-	(Spuren)
Genista tinctoria blühendes Kraut Frischdroge, 25,0 g	0,2687	-	-	0,657	-	-

Tabelle: Untersuchungen an Drogen
(Gewichtsangaben in mg)

	Aethanolamin	Dopamin	Cadaverin	Tyramin	Tryptamin	Histamin
<i>Aconitum napellus</i> Wurzelknolle, Frischdroge 50,0 g	0,0702	-	-	1,471	-	-
<i>Epilobium hirsutum</i> blühendes Kraut Frischdroge, 25,0 g	0,1646	-	-	0,094	-	-
<i>Solanum lycopersicum</i> blühendes Kraut Frischdroge, 25,0 g	0,049	0,224	(Spuren)	0,513	0,123	-
<i>Heliosperma quadridentatum</i> Kraut, getrocknet 5,0 g	0,145	-	-	2,097	-	-
<i>Epilobium hirsutum</i> blühendes Kraut getrocknet, 5,0 g	0,1152	-	-	0,5742	-	-
<i>Chamaenerion angustifolium</i> blühendes Kraut getrocknet, 5,0 g	0,1815	-	-	(Spuren)	-	-

3.2. Diskussion der Ergebnisse

Die in der Tabelle wiedergegebenen Ergebnisse bestätigen die beim Pflanzenscreening gefundenen Aminvorkommen.

Einzige Ausnahme war *Aconitum napellus*, in dessen Extrakt das qualitativ nachgewiesene Noradrenalin, vermutlich wegen der vorliegenden geringen Mengen, nicht mehr über das DNP-Umsetzungsprodukt bestimmt werden konnte.

Die Gehalte der Amine Aethanolamin, Dopamin, Cadaverin und Tryptamin bewegen sich im μg -Bereich.

Dagegen war Tyramin in *Limonium vulgare*, *Pelargonium reniforme* und *Heliosperma quadridentatum* in Mengen zwischen 2 bis 6,5 mg pro 5,0 Gramm enthalten.

In solchen Konzentrationen kann ein Amin bei oraler Einnahme pharmakologisch wirksam sein. In der Therapie kann diese Wirkung erwünscht oder unerwünscht sein.

Eine erwünschte Wirkung liegt vor, wenn das Amin eine definierte pharmakologische Wirkung in einem therapeutischen Sinne entfaltet. Tyramin hat z.B. eine **uterostyptische und uterotone Wirkung**.

Tatsächlich finden sich in der Literatur Hinweise, daß Drogen, die Tyramin enthalten, wie *Lamium album*, *Viscum*, *Sarothamnus scoparius* und *Capsella bursa pastoris*, in Teeform bei Menstruationsbeschwerden und Uterusblutungen verwendet werden.

Die eingeborenen Volksstämme in Südafrika verwenden einen Dekokt aus den Wurzeln von *Pelargonium reniforme* und anderen *Pelargonium*-Arten¹¹⁶⁾ zu dem gleichen Zweck. Auch diese Anwendung dürfte vollständig oder zum Teil dem nachgewiesenen Tyramin **zuzuschreiben sein**.

Ebenso übt das Histamin eine uterotone Wirkung auf die glatte Muskulatur aus. Zusammen mit Tyramin ist Histamin z.B. in *Lamium album* und *Secale cornutum* enthalten.

Wegen der synergistischen Wirkung beider Amine war bis vor kurzem eine Arzneispezialität (Tenosin® Bayer), die die Amine Tyramin und Histamin in Mengen von 2% bzw. 0,04% als Hydrochloride gelöst enthielt, als Uterostyptikum und Uterotonikum im Handel.

Die stichprobenartig durchgeführten Aminanalysen lassen erwarten, daß ein Drogenscreening mit Sicherheit neue Aminvorkommen und damit eine wissenschaftliche Erklärung für eine Reihe von Drogenanwendungen in der Volksmedizin erbringen wird.

Wie aber im Kapitel 1.3. bereits ausführlich dargelegt, besitzen die Amine auch unerwünschte Nebenwirkungen, die über einen längeren Zeitraum gebraucht, bei bestimmten Menschen sogar eine Kontraindikation bedeuten können.

Patienten, die monoaminoxidasehemmende Medikamente (MAO-Hemmer) nehmen, müssen in jedem Falle vor der Einnahme tyraminhaltiger Drogen und Zubereitungen gewarnt werden, weil es durch Kumulation zu erheblichem Blutdruckanstieg kommen kann.

Auch Histamin kann für Nebenwirkungen verantwortlich sein. Bei dem Genuß histaminhalter Weine kommt es beispielsweise zu Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen.

Zu berücksichtigen ist auch, daß durch gleichzeitige Anwesenheit von anderen Aminen in Pflanzen, wie Aethanolamin, Cadaverin und Putrescin, möglicherweise die Aminwirkung von Tyramin und Histamin synergistisch verstärkt werden kann¹⁶.

Aus unseren Untersuchungen ist deshalb die Forderung abzuleiten, alle arzneilich verwendeten Drogen oder Zubereitungen aus Drogen wegen der Gefahr von Nebenwirkungen auf ihren Amingehalt hin zu untersuchen, besonders, wenn sie zum Dauergebrauch bestimmt sind.

EXPERIMENTELLER TEIL

5.0. Arbeitsvorschrift zur Extraktion der Amine

Zum leichteren Nacharbeiten wird im Folgenden die vollständige Arbeitsvorschrift zur Extraktion und Bestimmung der Amine zusammenhängend dargestellt.

5.1. Screening

2,5 Gramm gepulverte oder geschnittene Droge werden mit 50 ml Wasser in ein Becherglas gegeben, mit einem Uhrglas bedeckt und 20 Minuten über Wasserdampf extrahiert. Die Lösung lässt man abkühlen. Die Ballaststoffe werden 10 Minuten lang bei 4000 U/Min. abzentrifugiert. Der wässrige Extrakt wird dekantiert und auf eine Säule gegeben, die einen Durchmesser von 17 mm und eine Länge von 200 mm hat und die zu 2/3 mit dem Ionenaustauscherharz Amberlite IRC-50, 20 - 50 mesh, schwach sauer, Gegenion Cl^- , gefüllt ist. Der Ionenaustauscher ist nach der Methode von Hirs, Moore und Stein¹²⁸⁾ gebrauchsfertig gemacht (siehe 7.1.6.).

Den Extrakt lässt man mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 20 Tropfen pro Minute durch die Säule fließen. Dann wird mit 100 bis 150 ml destilliertem Wasser gespült, bis das ablaufende Wasser klar ist.

Sodann werden die Amine und die verbliebenen Aminosäuren mit 4,5 N NH_4OH eluiert und das Eluat am Rotationsverdampfer bei 45°C auf 1 - 2 ml eingengt. Man gibt 1 ml Alkohol dazu und verwendet den Auszug zur Chromatographie.

Diese wird auf DC-Alufolien Cellulose ohne Fluoreszenzindikator Merck durchgeführt. Zur Entwicklung stehen zwei verschiedene, aber gleichwertige Laufmittel zur Verfügung:

1. Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O = 60 : 8 : 12 : 20
2. 2-Methyl-3-butin-2-ol : Ameisensäure : H_2O = 75 : 5 : 20

Nach dem Entwickeln (12 - 13 cm hoch) werden die Platten mit Warmluft getrocknet und dann mit Ninhydrin-Cadmiumacetat-Reagenz oder mit Folin Reagenz besprüht (siehe 6.2.8.).

Die Identifizierung der Amine erfolgt anhand von mitchromatographierten Testsubstanzen. Bei Verwendung von Ninhydrin-Cadmiumacetat-Reagenz müssen die Platten im Trockenschrank bei 100°C entwickelt werden.

5.2. Quantitative Bestimmung der Amine

0,5 bis 2,0 Gramm getrocknete, gemahlene Droge werden in einem 200 ml Becherglas auf dem Dampfbad mit 3mal 50 ml 0,01 N HCl extrahiert. Das Gefäß wird mit einem Uhrglas abgedeckt. Nach dem Erkalten werden die Extrakte vereinigt und 20 Minuten bei 4500 U/Min. zentrifugiert. Die überstehenden, klaren Extrakte werden dekantiert oder filtriert und mit dem

Alkalipuffer (siehe 7.6.11.) auf einen pH von 6 bis 6,5 gebracht.

Bei gefriergetrockneten Drogen werden 1,0 bis 2,0 des Lyophilisates in 50 ml 0,01 N HCl über Wasserdampf gelöst, abgekühlt und mit Alkalipuffer auf pH 6 bis 6,5 gebracht.

Dann werden die Extrakte in gleicher Weise weiterbehandelt:

Am Rotationsverdampfer wird die Lösung auf 30 bis 50 ml eingengt. Sie sollte dann einen pH von etwa 8 haben.

Zur Abtrennung der restlichen Ballaststoffe wird der Extrakt auf eine spezielle Säule gegeben: Diese besteht aus einer Glasfritte mit der Porengröße G 4, die einen Durchmesser von 2 cm hat und mindestens 15 cm lang ist. Sie wird auf eine Saugflasche gesetzt und bei leichtem Unterdruck zunächst mit einer Suspension eines nach einem speziellen Verfahren zubereiteten Polyamids etwa 15 mm hoch gefüllt (siehe 7.6.1.5.). Auf die feste Polyamidschicht gießt man mittels eines Glasstabes vorsichtig Sephadex LH 20 Gel, das man, ebenso wie das Polyamid, mindestens 24 Stunden in Alkohol : Wasser = 1 : 2 vorquellen ließ. Die Sephadex-Schicht sollte je nach eingesetzter Drogenmenge zwischen 6 und 10 cm hoch sein. Die Säule wird mit etwa 30 ml einer Mischung aus Alkohol : 0,01 N HCl : H_2O = 1 : 1 : 1 gespült, bevor der Pflanzenextrakt aufgetragen wird.

Dieser wird mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 80 Tropfen pro Minute durch die Säule gesaugt und mit 90 ml der Mischung Alkohol : H_2O : 0,01 N HCl = 1 : 1 : 1 nachgewaschen.

Das Eluat hat dann einen pH von 6,5. Es wird in einen 500 ml Schliffkolben gefüllt und am Rotationsverdampfer bei 45°C auf 10 ml eingengt.

Zur Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol muß der Extrakt auf 0,5 bis 1,0 ml eingeengt werden. Für diesen Ansatz ist der 500 ml Kolben zu groß, deshalb wird der Extrakt in einen 100 ml Schliffkolben gespült und bis fast zur Trockene einrotiert (45°C). Durch Zugabe von etwas Alkohol vermeidet man ein Verspritzen der Lösung.

Zur Umsetzung wird der Extrakt mit 0,7 ml 0,01 N HCl zu 1 ml ergänzt. Dazu pipettiert man 2,0 ml der acetonischen DNFB-Lösung (siehe 7.5.1.2.) und 1,0 ml Natriumhydrogencarbonatpuffer (siehe 7.5.1.3.).

Der Kolben mit der Reaktionslösung wird mit einem Glasstopfen locker verschlossen und zur Umsetzung 40 Minuten in ein Wasserbad von 60°C gestellt. Von Zeit zu Zeit wird vorsichtig geschüttelt.

Zeigt sich nach wenigen Minuten keine kräftige Gelbfärbung, deutet dies auf einen zu sauren pH des Aminextraktes hin. In diesem Fall kann durch Abpuffern mit einer Spatelspitze NaHCO_3 (= 5 bis 7 mg) die Umsetzung in Gang gebracht werden.

Anschließend werden 0,4 ml der Glycin- NaHCO_3 -Pufferlösung (siehe 7.5.1.4.) zugegeben, um das überschüssige DNFB zu binden. Die Lösung bleibt für weitere 20 Minuten im Wasserbad.

Nach dem Abkühlen werden die DNP-Amine ausgeschüttelt. Dazu wird ein Gemisch von Aceton : Äther = 2 : 3 verwendet. Man spült zuerst die Reaktionslösung in ein mit einem Schliffstopfen verschließbares, 10 ml fassendes Zentrifugenglas, weil sich darin die Phasen besser trennen lassen. Zur schnellen Entmischung der Phasen wird nach jedem Aus-

schütteln das Glas bei 2500 U/Min. kurz zentrifugiert und die klaren Aceton : Aetherphasen, die die DNP-Amine enthalten, abgehoben und in einen 50 ml Schliffstehkolben pipettiert. Die Aceton : Aetherphasen werden am Rotationsverdampfer bei 45^o C vorsichtig zur Trockene eingengt. Trübt sich die Lösung beim Einrotieren, setzt man noch einige Milliliter Aceton zu.

In dem Kolben sind die DNP-Amine quantitativ enthalten. Sie werden in 2,00 ml Aceton p.A. gelöst. Gelegentlich sind die Lösungen durch anorganische Salze leicht getrübt. Sie werden dann in einem verschließbaren Zentrifugenglas 5 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Die klare Lösung wird in einen 50 ml Schliffkolben dekantiert und chromatographiert.

Die Dünnschichtchromatographie wird auf Kieselgel 60 F 254 Platten Merck ausgeführt. Von der Aminlösung werden 20 oder 40 µl punktförmig aufgetragen. Die Platten werden 2mal etwa 11 bis 12 cm hoch entwickelt (Temperatur ca. 20^o C) und nach jedem Entwickeln mit Warmluft getrocknet. Die Identifizierung erfolgt anhand von mitchromatographierten Testsubstanzen.

Von jedem Extrakt werden vier Parallelbestimmungen gemacht. Die Extrakte werden je nach dem Ergebnis des Screenings in einem der nachstehenden vier Laufmittel entwickelt (siehe 3.7.).

1. Toluol : Aethylacetat = 50 : 40
2. Petrolaether : Aethylacetat = 20 : 80
3. Toluol : Aethylacetat : 2-Butanon : Methanol = 50 : 40 : 25 : 5
4. Toluol : Aethylacetat = 50 : 20

Die Substanzzonen werden unter dem UV-Licht mit Bleistift markiert, mit einem feinen Spatel vorsichtig abgeschabt, in Reagenzgläser überführt und mit 5,0 ml Methanol p.A. und einigen Glaskügelchen auf dem "Whirli Mixer" quantitativ extrahiert. Zum Abtrennen des Kieselgels werden die Suspensionen in Zentrifugengläser gegeben und 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wird direkt in die Küvetten dekantiert und gegen den Blindwert (Methanol p.A.) im Spektralphotometer bei 350 nm gemessen.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt anhand der Umrechnungsformeln für DNP-Amine (siehe 7.5.6.).

6.0. Allgemeine Arbeitsmethoden

6.1. Herkunft der Drogen

Pelargonium reniforme und die *Cassine*-Arten wurden von Frau Dr. S. Bladt in Südafrika und Rhodesien gesammelt. Eine Probe von *Pelargonium* stellte das Iso-Werk, Regensburg, zur Verfügung.

Limonium vulgare und *Heliosperma quadridentatum* sind von Frau Dr. K. Galle in Jugoslawien gesammelt worden.

Ein großer Teil der Drogen stammt aus Institutsbeständen; alle anderen bezogen wir von der Firma Caelo, Hilden.

Die frischen Pflanzen sammelten wir im Bereich Diessen Ammersee. *Solanum lycopersicum* stammt aus der Klostergärtnerei St. Bonifaz zu München.

6.2. Dünnschichtchromatographie

6.2.1. Adsorbens

- a) DC-Alufolien Cellulose ohne Fluoreszenzindikator Merck, 20mal 20 cm, Schichtdicke 0,10 mm
- b) Kieselgel- 60 mesh - F 254 Fertigplatten Merck, 20mal 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm.

6.2.2. Laufmittelsysteme

- a) Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O = 60 : 8 : 12 : 20
- b) 2-Methyl-3-butin-2-ol : Ameisensäure : H_2O = 75 : 5 : 20
- c) Toluol : Aethylacetat = 50 : 40
- d) Petrolaether : Aethylacetat = 20 : 80
- e) Toluol : Aethylacetat : 2-Butanon : Methanol = 50 : 40 : 25 : 5
- f) Toluol : Aethylacetat = 50 : 20

6.2.3. Auftragen der Lösungen zur DC

Zum bandförmigen Auftragen der Lösungen verwendeten wir einen Cordis Mikroapplikator für organische Lösungsmittel, der 10 μl bei einem Vor- gang in einer Breite von etwa 23 mm aufträgt.

Punkt förmiges quantitatives Auftragen für die Bestimmungen führten wir mit Blutzuckerpipetten aus und maschinell mit dem Unimetrics-TLC-Multi- spotter (Vertretung Firma Macherey u. Nagel, Düren). Dieses Gerät er- laubt das gleichzeitige Auftragen von 8 Lösungen mit teflonisierten Spe- zialspritzen. Man wählt eine Kolbenvorschubgeschwindigkeit von 5 und eine Plattenvorheizung von 45°C ¹²⁹⁾.

6.2.4. Entwicklungskammer

Zur Dünnschichtchromatographie werden Simultan-Trennkammern der Firma Desaga, Heidelberg, verwendet. Die Kammern werden mit 100 ml des Fließmittels gefüllt. Eine Kammersättigung ist nicht notwendig.

6.2.5. Bedingungen im Arbeitsraum

Die Chromatogramme werden in einem klimatisierten Raum entwickelt, der eine konstante Temperatur von 20°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) aufweist.

6.2.6. Trocknung

Zwischen den zwei Entwicklungsvorgängen und nach Abschluß der Chromatographie werden die Platten mit Warmluft getrocknet.

6.2.7. Entwicklung der Ninhydrin-Flecken

Die Aluminiumfolien werden mit Warmluft getrocknet und mit Ninhydrin-Cadmiumacetat-Reagenz besprüht, bis die Folie gleichmäßig feucht ist. Dann wird diese zur Entwicklung in den Trockenschrank bei 100°C gestellt.

6.2.8. Sprühreagentien

6.2.8.1. Ninhydrin-Cadmiumacetat-Reagenz

0,5 Gramm Cadmiumacetat werden in 50 ml H_2O gelöst, 10 ml Eisessig dazugegeben, dann wird mit Butanol ad 500 ml aufgefüllt.

Von dieser Lösung werden jeweils 100 ml entnommen und darin 0,2 Gramm Ninhydrin aufgelöst. Die gebrauchsfertige Lösung kann im Kühlschrank eine Woche aufbewahrt werden.

6.2.8.2. Folin-Reagenz

Sprühlösung nach Muting¹³⁰⁾: 0,2 Gramm Naphthochinon-1,2-sulfonsäure-4-Natriumsalz werden in 100 ml einer 5%igen Natriumcarbonatlösung aufgelöst. Das Aufsprühen soll etwa 10 - 15 Minuten nach Herstellung der Sprühlösung erfolgen.

6.3. Säulenchromatographie

6.3.1. Ionenaustauschersäule

Die Säule hat eine Länge von 200 mm und einen Durchmesser von 17 mm. Sie wird zu 2/3 mit dem Ionenaustauscher Amberlite IRC-50, 20 - 50 mesh, schwach sauer, Gegenion Cl^- , gefüllt.

6.3.2. Polyamid-Sephadex-Speziälsäule

Die Säule besteht aus einer Glasfritte mit der Porengröße G 4, die 150 mm lang ist und einen Durchmesser von 20 mm hat. Sie wird 15 mm hoch mit einem speziell zubereiteten Polyamid (siehe 6.6.1.5.) und darauf zwischen 60 und 100 mm hoch mit Sephadex LH 20 Gel gefüllt.

6.4. Physikalische Untersuchungen

6.4.1. Schmelzpunkte

Die Substanzen werden bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet und über Phosphorpentoxyd im Exsiccator aufgehoben. Die Schmelzpunkte bestimmten wir mit dem Kofler Heitztischmikroskop, Firma C. Reichert, Austria.

6.4.2. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit dem UV-Spektrometer DK-2 der Firma Beckman aufgenommen.

6.4.3. UV-Absorptionsmessungen

UV-Absorptionsmessungen zur Bestimmung der Extinktion wurden mit einem Hitachi UV-vis Spectrometer 181-6 in 10 mm Küvetten durchgeführt.

6.4.4. IR-Überlagerungsspektren

Die Überlagerungsspektren wurden mit einem Beckman-Infrared-Spectrophotometer IR 8 aufgenommen. Von der Testsubstanz wurden jeweils 1 mg, von der isolierten Substanz 1,3 mg mit 150 mg Kaliumbromid verrieben und zu Presslingen verarbeitet.

6.4.5. NMR-Spektren

Die Kernresonanzspektren wurden mit einem Varian A-60 A Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Zur Messung verwendet wurden 23 bis 30 mg Substanz, die in 0,5 ml Hexadeuterodimethylsulfoxyd ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$ oder Deuteriochloroform (CDCl_3) oder deuteriertem Dimethylsulfoxyd (DMSO-d_6) gelöst waren.

6.4.6. Verarbeitung der Meßwerte

Zur Ermittlung der statistischen Größen aus den Meßergebnissen verwendeten wir einen elektronischen Tischcomputer Programm 101 der Firma Olivetti. Die erforderlichen Rechenprogramme wurden nach einem Olivetti Standardprogramm auf Magnetkarten abgespeichert.

Herrn O. Seligmann und Frau Bohm danke ich für die Aufnahme der IR- und NMR-Spektren.

Herrn O. Seligmann und Herrn Dr. V.M. Chari danke ich besonders für die Hilfe bei der Diskussion und Auswertung der NMR-Spektren.

7.0. Spezielle Arbeitsmethoden

7.1. Screening der Drogen

7.1.1. Extraktion der Amine über Ionenaustauscher

2,5 Gramm gepulverte oder geschnittene Droge werden mit 50 ml Wasser in ein Becherglas gegeben, mit einem Uhrglas bedeckt und 20 Minuten über Wasserdampf extrahiert. Die Lösung lässt man abkühlen und die Ballaststoffe werden 10 Minuten lang bei 4000 U/Min. abzentrifugiert. Der wässrige Extrakt wird dekantiert und auf eine Säule gegeben, die einen Durchmesser von 17 mm und eine Länge von 200 mm hat und die zu 2/3 mit dem Ionenaustauscherharz Amberlite IRC-50, 20 - 50 mesh, schwach sauer, Gegenion Cl^- , gefüllt ist. Der Ionenaustauscher ist nach der Methode von Hirs, Moore und Stein gebrauchsfertig gemacht¹²⁸⁾. Den Extrakt lässt man mit einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 20 Tropfen pro Minute durch die Säule fließen. Dann wird mit reichlich (100 bis 150 ml) destilliertem Wasser gespült, bis das ablaufende Wasser klar ist. Sodann werden die Amine und die verbliebenen Aminosäuren mit 4,5 N NH_4OH ausgeschwemmt und das Eluat am Rotationsverdampfer bei 45°C auf 1 bis 2 ml eingengt. Man gibt 1 ml Alkohol dazu und verwendet den Auszug zur Chromatographie.

7.1.2. Adsorbens

DC-Alufolien Cellulose ohne Fluoreszenzindikator. Merck, 20mal 20 cm, Schichtdicke 0,10 mm.

7.1.3. Fließmittelsysteme

n-Butanol : Pyridin : Eisessig : H_2O = 60 : 8 : 12 : 20

2-Methyl-3-butan-2-ol : Ameisensäure : H_2O = 75 : 5 : 20

7.1.4. Laufzeit

4 Stunden über eine Wegstrecke von 12 bis 13 cm.

7.1.5. Detektion

Besprühen mit Ninhydrin-Cadmiumacetat-Reagenz, danach Entwickeln im Trockenschrank bei 100°C .

Besprühen mit Folin Reagenz.

7.1.6. Aufbereitung des Ionenaustauschers

1000 Gramm Amberlite IRC-50 werden in einem Erlenmeyerkolben von 10 Liter Inhalt mit reichlich 4%iger Salzsäure gewaschen. Dann lässt man das Harz absetzen, dekantiert die Flüssigkeit und wäscht mehrmals mit destilliertem Wasser, bis der pH neutral ist. Darauf gießt man das Wasser ab und wäscht mit 4%iger Natronlauge. Danach neutralisiert man wieder mit H_2O und beginnt die ganze Prozedur von neuem.

Am Ende wird das neutrale Harz mit der 4%igen Salzsäure gewaschen. Das Harz ist somit gebrauchsfertig. Es wird in feuchtem Zustand aufbewahrt.

7.2. Herstellung der Testsubstanzen

Die Ausgangssubstanzen wurden von der Firma Serva in "pro analysi" Qualität erhalten.

7.2.1. DNP-Aethanolamin, -Tryptamin, -Serotonin

Zur Darstellung der Testsubstanzen werden in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen je 2 mMol Aminhydrochlorid in 20 ml Wasser gelöst. Dazu pipettiert man 15 Tropfen 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol, entsprechend 2,5 mMol. Diese Lösung stellt man 40 Minuten in ein Wasserbad von 60°C. Der Stopfen wird locker aufgesetzt, nach 10 Minuten werden 5 bis 8 ml Aceton ergänzt. Von Zeit zu Zeit wird die Lösung vorsichtig geschüttelt.

Anschließend gibt man eine Messerspitze Natriumhydrogencarbonat dazu und lässt auf Zimmertemperatur abkühlen. DNP-Tyramin und -Serotonin kristallisieren beim Abkühlen aus. DNP-Aethanolamin bleibt in Lösung und wird mit kleinen Portionen Äther in einem 250 ml Schütteltrichter ausgeschüttelt und kristallisiert nach dem Einengen aus (siehe unter 3.2.).

7.2.2. Herstellung der bis- und tri-DNP-Amine

In einem verschließbaren 250 ml Erlenmeyerkolben werden 2 mMol des Aminhydrochlorids in 20 ml Aceton und 4 mMol NaHCO_3 in 20 ml H_2O zusammen gelöst, dazu 30 Tropfen DNFB, entsprechend 5 mMol, gegeben und die Lösung 40 Minuten bei 60°C im Wasserbad gehalten. Anschließend gibt man eine Messerspitze Natriumhydrogencarbonat zu und lässt auf Zimmertemperatur abkühlen.

Die entstehenden Dinitrophenylamine fallen mit Ausnahme derer von Noradrenalin und Dopamin spontan aus. Man lässt sie über Nacht vollkommen auskristallisieren.

Tri-DNP-Noradrenalin und -Dopamin werden in einem Schütteltrichter von 250 ml Inhalt mit kleinen Portionen Aether ausgeschüttelt, einrotiert, dann in heißem Methanol aufgenommen und auskristallisiert.

7.2.3. Umkristallisieren

Die DNP-Amine von Tyramin, Tryptamin, Serotonin, Cadaverin, Histamin und Putrescin werden aus heißem Aethylmethylketon umkristallisiert. Tri-DNP-Noradrenalin und -Dopamin werden aus heißem Methanol und DNP-Aethanolamin wird aus heißem 2,2-sym-Tetrachloraethan auskristallisiert.

7.2.4. Molekulargewichte der Aminausgangssubstanzen

	MG
Aethanolamin · HCl	97,55
Tyramin · HCl	173,64
Histamin · HCl	184,10
Tryptamin · HCl	196,68
Cadaverin · 2HCl	175,11
Putrescin · 2HCl	161,08
Dopamin · HCl	189,64
Serotonin · HCl	212,68
Noradrenalin · HCl	205,64

7.3. Die Eichgeraden der Dinitrophenylamine

4 μ Mol von jeder DNP-Testsubstanz werden in einem Meßkolben zu 100,00 ml in Methanol p.A. gelöst. Von diesen gleichmolaren Lösungen werden Verdünnungsreihen hergestellt (DNP-Putrescin muß in NN-Dimethylformamid : Methanol = 50 : 50 gelöst werden).

In jeweils 5 bereitgestellte, mit Glasstopfen verschließbare Zentrifugengläser werden der Reihe nach 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 8,0 und 10,0 ml einer Eichlösung pipettiert und mit Methanol p.A. zu 10,0 ml aufgefüllt.

In den Gläsern sind dann entsprechen 0,08 ; 0,16 ; 0,24 ; 0,32 und 0,40 Mol des betreffenden Dinitrophenylamins enthalten.

Im Spektralphotometer werden die Extinktionen der Lösungen in Quarzküvetten (d = 10 mm) bei 350 nm, bzw. 360 nm für Putrescin durchgeführt.

Den speziellen Extinktionskoeffizienten berechneten wir nach der Gleichung:

$$\epsilon' = \frac{E}{C'} = \frac{\text{Extinktion}}{\text{Aminkonzentration in Mol/Meßansatz}}$$

Für die Berechnung waren in der Regel 30 bis 40 Einzelbestimmungen aus zwei Ansätzen notwendig. Der spezielle Extinktionskoeffizient E' errechnet sich als Mittelwert aus den Extinktionskoeffizienten der Einzelbestimmungen.

7.3.1. Die Eichgerade von DNP-Aethanolamin

Das Molekulargewicht von DNP-Aethanolamin:

$$227,18 \text{ Gramm} = 1 \text{ Mol}$$

$$0,22718 \text{ mg} = 1 \mu\text{Mol}$$

$$0,90872 \text{ mg} = 0,909 \text{ mg ad } 100 \text{ ml Methanol} = 4 \mu\text{Mol}$$

Von der Substanz löst man 9,09 mg ad 100,0 ml Methanol. 10,0 ml dieser Lösung werden ad 100,0 ml mit Methanol verdünnt, womit die richtige Konzentration der Eichlösung erreicht ist.

	E						MW	ϵ'
2 ml = 0,08 μMol	0,141	0,140	0,139	0,142	0,142	0,142	0,141	1,76
4 ml = 0,16 μMol	0,271	0,274	0,274	0,272	0,275	0,273	0,2732	1,7075
6 ml = 0,24 μMol	0,419	0,419	0,420	0,419	0,418	0,420	0,419	1,746
8 ml = 0,32 μMol	0,556	0,556	0,551	0,550	0,552	0,560	0,554	1,73125
10 ml = 0,40 μMol	0,689	0,685	0,685	0,680	0,691	0,691	0,6868	1,717

$$\bar{\epsilon} = 1,73235$$

$$\epsilon'_{\text{DNP-Aethanolamin}} = 1,73$$

Fehlerrechnung für den speziellen Extinktionskoeffizienten:

Mittelwert ϵ'	$M = 1,732350$
Standardabweichung	$S = 0,021236$
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_s = 0,006715$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 1,2258\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = + 0,3876\%$

7.3.2. Die Eichgerade von DNP-Tryptamin

Molekulargewicht von DNP-Tryptamin

$$326,32 \text{ Gramm} = 1 \text{ Mol}$$

$$0,32632 \text{ mg} = 1 \mu\text{Mol}$$

$$1,30528 \text{ mg} = 1,305 \text{ mg ad } 100 \text{ ml Methanol} = 4 \mu\text{Mol}$$

	E						MW	ϵ'
0,08 μMol	0,149	0,152	0,157	0,153	0,154	0,152	0,153	1,9125
0,16 μMol	0,297	0,300	0,300	0,301	0,298	0,302	0,2996	1,8725
0,24 μMol	0,448	0,451	0,451	0,455	0,452	0,450	0,4512	1,880
0,32 μMol	0,595	0,599	0,600	0,603	0,598	0,600	0,5992	1,8725
0,40 μMol	0,740	0,745	0,748	0,750	0,747	0,745	0,746	1,8650

$$\bar{\epsilon} = 1,8805$$

$$\epsilon' \text{ DNP-Tryptamin} = 1,88$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	M	=	1,880500
Standardabweichung	S	=	0,018654
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s	=	0,005898
Variabilitätskoeffizient	V	=	$\pm$ 0,9919%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	S _v	=	$\pm$ 0,3136%

7.3.3. Eichgerade von DNP-Serotonin

Molekulargewicht von DNP-Serotonin

$$342,39 \text{ Gramm} = 1 \text{ Mol}$$

$$0,34239 \text{ mg} = 1 \mu\text{Mol}$$

$$1,36956 \text{ mg} = 1,37 \text{ mg ad } 100 \text{ ml Methanol} = 4 \mu\text{Mol}$$

	E	MW	ϵ'
0,08 μMol	0,139 0,141 0,142 0,145 0,148 0,149	0,144	1,800
0,16 μMol	0,272 0,276 0,277 0,278 0,280 0,280	0,2772	1,7325
0,24 μMol	0,415 0,416 0,418 0,420 0,425 0,424	0,420	1,750
0,32 μMol	0,565 0,560 0,565 0,565 0,560 0,565	0,563	1,759
0,40 μMol	0,700 0,710 0,708 0,708 0,710 0,708	0,707	1,7675

$$\phi = 1,7618$$

$$\epsilon'_{\text{DNP-Serotonin}} = 1,76$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	$M = 1,761800$
Standardabweichung	$S = 0,024979$
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_s = 0,007899$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 1,4178\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,4483\%$

7.3.4. Eichgerade für bis-DNP-Putrescin

Das Absorptionsmaximum für bis-DNP-Putrescin liegt bei 360 nm.

Molekulargewicht von bis-DNP-Putrescin

$$420,35 \text{ Gramm} = 1 \text{ Mol}$$

$$0,42035 \text{ mg} = 1 \mu\text{Mol}$$

$$1,6814 \text{ mg} = 1,68 \text{ mg ad } 100 \text{ ml Methanol} = 4 \mu\text{Mol}$$

μMol	E						MW	ϵ'
0,08	0,270	0,275	0,272	0,275	0,278	0,274	0,274	3,425
0,16	0,549	0,551	0,552	0,552	0,550	0,552	0,551	3,443
0,32	0,818	0,818	0,818	0,818	0,818	0,818	0,818	3,40

$$\bar{\phi} = 3,42266$$

$$\epsilon' \text{ bis-DNP-Putrescin} = 3,42$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	$M = 3,422666$
Standardabweichung	$S = 0,021771$
Mittlerer Fehler der Standardabweich.	$S_s = 0,008887$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 0,6360\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,2596\%$

7.3.5. Eichgerade von bis-DNP-Cadaverin

Molekulargewicht von bis-DNP-Cadaverin

434,38 Gramm	= 1 Mol
0,43438 mg	= 1 μ Mol
1,73752 mg	= 1,74 mg ad 100,0 ml Methanol = 4 μ Mol

μ Mol	E						MW	ϵ'
0,08	0,272	0,275	0,279	0,275	0,274	0,277	0,27533	3,4416
0,16	0,548	0,548	0,549	0,550	0,546	0,549	0,54833	3,427
0,24	0,810	0,812	0,812	0,811	0,813	0,810	0,81133	3,380
0,32	1,092	1,095	1,095	1,092	1,094	1,096	1,094	3,41875
0,40	1,345	1,345	1,346	1,344	1,346	1,346	1,34533	3,36332

$$\emptyset = 3,406134$$

$$\epsilon'_{\text{bis-DNP-Cadaverin}} = 3,40$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	$M = 3,406134$
Standardabweichung	$S = 0,033045$
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_s = 0,010449$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 0,9701\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,3067\%$

7.3.6. Eichgerade für bis-DNP-Histamin

Molekulargewicht von bis-DNP-Histamin

$$443,35 \text{ Gramm} = 1 \text{ Mol}$$

$$0,44335 \text{ mg} = 1 \mu\text{Mol}$$

$$1,7734 \text{ mg} = 1,77 \text{ mg ad } 100,0 \text{ ml Methanol} = 4 \mu\text{Mol}$$

μMol	E						MW	ϵ'
0,08	0,181	0,185	0,190	0,188	0,185	0,190	0,1865	2,331
0,16	0,359	0,361	0,360	0,359	0,359	0,361	0,35983	2,2489
0,24	0,542	0,542	0,548	0,550	0,547	0,544	0,5455	2,2729
0,32	0,715	0,715	0,720	0,716	0,719	0,720	0,7175	2,2422
0,40	0,900	0,900	0,901	0,902	0,899	0,902	0,90066	2,25165

$$\bar{\epsilon} = 2,26933$$

$$\epsilon'_{\text{bis-DNP-Histamin}} = 2,27$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	M = 2,269330
Standardabweichung	S = 0,036331
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _v = 0,011488
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm$ 1,6009%
Schätzwert für den mittleren Fehler des	S _v = $\pm$ 0,5063%
Variabilitätskoeffizienten	

7.3.7. Eichgerade von bis-DNP-Tyramin

Molekulargewicht von bis-DNP-Tyramin

469,38 Gramm = 1 Mol

0,46938 mg = 1 μ Mol

1,87752 mg = 1,877 mg ad 100,0 ml Methanol = 0,4 μ Mol

μ Mol	E							MW	ϵ'
0,08	0,158	0,161	0,164	0,165	0,165	0,168	0,168	0,1645	2,056
0,16	0,320	0,325	0,323	0,323	0,321	0,321	0,321	0,3218	2,0116
0,24	0,485	0,489	0,489	0,489	0,482	0,482	0,482	0,485	2,0058
0,32	0,635	0,642	0,649	0,642	0,640	0,640	0,640	0,641	2,0033
0,40	0,790	0,792	0,795	0,796	0,793	0,793	0,793	0,79312	1,98275

$$\bar{\epsilon} = 2,01189$$

$$\epsilon'_{\text{bis-DNP-Tyramin}} = 2,01$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	$M = 2,011890$
Standardabweichung	$S = 0,026944$
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_s = 0,008520$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 1,3392\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,4234\%$

7.3.8. Eichgerade von tri-DNP-Dopamin

Molekulargewicht von tri-DNP-Dopamin

651,55 Gramm = 1 Mol

0,65155 mg = 1 μ Mol

2,6062 mg = 2,60 mg ad 100 ml Methanol = 0,4 μ Mol

μ Mol	E						MW	ϵ'
0,08	0,160	0,160	0,161	0,160	0,160	0,161	0,160	2,00
0,16	0,322	0,322	0,321	0,320	0,321	0,320	0,321	2,0062
0,24	0,486	0,482	0,485	0,485	0,486	0,485	0,48483	2,0201
0,32	0,648	0,648	0,649	0,646	0,647	0,647	0,6475	2,0234
0,40	0,808	0,808	0,808	0,812	0,808	0,809	0,80883	2,0220

$$\bar{\phi} = 2,01434$$

$$\epsilon' \text{ tri-DNP-Dopamin} = 2,01$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert ϵ'	$M = 2,014340$
Standardabweichung	$S = 0,010583$
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_s = 0,003346$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 0,5253\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,1661\%$

7.3.9. Eichgerade von tri-DNP-Noradrenalin

Molekulargewicht von tri-DNP-Noradrenalin

667,48 Gramm = 1 Mol

0,66748 mg = 1 μ Mol

2,66992 mg = 2,67 mg ad 100,0 ml Methanol = 4 μ Mol

μ Mol	E						MW	ϵ'
0,08	0,160	0,161	0,161	0,160	0,161	0,161	0,16066	2,0082
0,16	0,322	0,321	0,321	0,321	0,320	0,320	0,320833	2,0052
0,24	0,489	0,487	0,485	0,482	0,480	0,480	0,483833	2,0159
0,32	0,650	0,649	0,650	0,645	0,640	0,641	0,645833	2,0182
0,40	0,820	0,818	0,818	0,815	0,810	0,812	0,8155	2,0387

$$\bar{\epsilon} = 2,01724$$

$$\epsilon'_{\text{tri-DNP-Noradrenalin}} = 2,01$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert $\bar{x}$	$M = 2,017240$
Standardabweichung	$S = 0,013114$
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_g = 0,004147$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 0,6500\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,2055\%$

7.4. Dünnschichtchromatographie der DNP-Amine

Sorbens: Kieselgel 60 F 254 Fertigplatten

Entwicklungshöhe: 2mal 12 cm

Zwischen der ersten und zweiten Entwicklung wird die Platte mit Warmluft getrocknet und dann in derselben Kammer erneut entwickelt.

Laufzeit:
1. Entwicklung ca. 90 Minuten
2. Entwicklung ca. 60 Minuten

Auswertung: Erfolgt im UV-Licht (254 nm).

Laufmittel 1: Toluol : Aethylacetat = 50 : 40

Laufmittel 2: Petrolaether : Aethylacetat = 20 : 80

Laufmittel 3: Toluol : Aethylacetat : 2-Butanon : Methanol
= 50 : 40 : 25 : 5

Laufmittel 4: Toluol : Aethylacetat = 50 : 20

7.5. Umsetzungen kleiner Aminmengen mit DNFB

7.5.1. Reagenzlösungen

7.5.1.1. Aminlösungen

Jeweils 8 oder 16 mg eines Aminhydrochlorids werden in einem Meßkölbchen in 10,0 ml 0,01 N HCl gelöst. 0,5 ml der Lösungen enthalten 0,4 bzw. 0,8 mg Aminhydrochlorid. Die Lösungen werden stets frisch bereitet.

7.5.1.2. Acetonische DNFB-Lösung

30 Tropfen Dinitrofluorbenzol, entsprechend 5 mMol, werden in einem Meßkolben mit 100,0 ml Aceton gemischt. Ein Milliliter dieser Lösung enthält dann 50 μ Mol DNFB.

7.5.1.3. Pufferlösung

840 mg Natriumhydrogencarbonat, entsprechend 10 mMol, werden in einem Meßkolben in 100,0 ml destilliertem Wasser gelöst. 0,5 ml der Lösung enthalten 50 μ Mol NaHCO_3 .

7.5.1.4. Glycin-Natriumbicarbonat-Puffer

375,4 mg, entsprechend 5 mMol Glycin und 420,0 mg Natriumhydrogencarbonat, entsprechend 5 mMol, werden in 100,0 ml destilliertem Wasser gelöst.

Diese drei Lösungen können im Kühlschrank 14 Tage aufbewahrt werden.

7.5.2. Die Umsetzung

0,5 ml Aminlösung, 1,0 ml acetonische DNFB-Lösung und 0,5 ml NaHCO_3 -Pufferlösung werden in mit Glasstopfen verschließbare Zentrifugengläser von 10 ml Inhalt pipettiert.

Die Reaktionsgemische werden 40 Minuten lang in ein Wasserbad von 60°C gestellt und gelegentlich umgeschüttelt. Die Glasstopfen müssen wegen der entweichenden Gase locker aufgesetzt werden.

Man gibt 0,2 ml Glycin- NaHCO_3 -Puffer dazu und belässt die Gläser weitere 20 Minuten in dem Wasserbad.

7.5.3. Die Extraktion der Amine

Nach dem Abkühlen werden die DNP-Amine in den Zentrifugengläsern mit kleinen Portionen (3 - 4 ml) von Aceton : Äther : 2 : 3 quantitativ ausgeschüttelt. Die Oberphasen werden mit einer 5 ml Pipette abgehoben, in einen 50 ml Stehkolben mit Schliff überführt und am Rotationsverdampfer bei 45°C zur Trockene eingeeengt.

Die Kolben werden auf Zimmertemperatur abgekühlt und die DNP-Amine mit genau 2,0 ml Aceton p.A. gelöst.

20 oder 40 μl dieser Lösungen werden zur Chromatographie verwendet.

7.5.4. Präparative, quantitative Dünnschichtchromatographie

Die Drogenextrakte werden punktförmig auf die Kieselgelplatten aufgetragen und im geeigneten Laufmittel entwickelt, wie unter 5.2.3. bis 5.2.6. beschrieben. Die in Frage kommenden Substanzzonen und eine gleichgroße substanzfreie Zone als Blindwert werden unter UV-Licht bei 254 nm mit dem Bleistift markiert, ausgeschabt, in ein Reagenzglas gefüllt und mit 5,0 ml Methanol p.A. eluiert. Nach dem Zentrifugieren bei 3000 U/Min. (10 Minuten) werden die Extinktionen der Lösungen in Quarzküvetten (d = 10 mm) gegen den Blindwert bestimmt.

7.5.5. Beleganalysen zur quantitativen Bestimmung

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen der einzelnen Amine wiedergegeben.

Von den Aminhydrochloridstammlösungen werden je drei Ansätze angefertigt, die 8 bzw. 16 mg Aminhydrochlorid in 10,0 ml 0,01 N HCl enthalten. Von jedem Ansatz wird eine Probe zu 0,5 ml umgesetzt. Von den daraus entstandenen DNP-Aminlösungen werden je drei Startpunkte aufgetragen und wie beschrieben bestimmt.

Für diese Untersuchungsreihen stellte die Firma Macherey und Nagel, Düren, einen "Unimetrics TLC-Multispotter" zur Verfügung, der mit teflonisierten Spezialspritzen bestückt ist und mit dem gleichzeitig acht Extrakte punktförmig aufgetragen werden können.

Bis-DNP-Tyramin: 16 mg Tyramin · HCl werden zu 10,0 ml 0,01 N
HCl gelöst. Davon 0,5 ml umgesetzt = 0,8 mg

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
20	0,209	0,0006679	83,5
20	0,215	0,0006870	85,9
20	0,210	0,0006711	83,9
40	0,428	0,0007318	84,6
40	0,423	0,0007334	84,7
40	0,423	0,0007334	84,7
20	0,215	0,0006870	85,9
20	0,215	0,0006870	85,9
20	0,212	0,0006775	84,7

$$\bar{Q} = 84,9$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 84,8666
Standardabweichung	S = 0,8847
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	$S_s = 0,2085$
Variabilitätskoeffizient	$V = \pm 1,04\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	$S_v = \pm 0,24\%$

DNP-Aethanolamin: 16 mg Aethanolamin . HCl/10,0 ml 0,01 N HCl

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
40	0,330	0,0007990	99,9
40	0,331	0,0008014	100,2
40	0,330	0,0007990	99,9
40	0,340	0,0008232	102,9
40	0,335	0,0008111	101,4
40	0,336	0,0008135	101,7
40	0,333	0,0008062	100,8
40	0,336	0,0008135	101,7
40	0,330	0,0007990	99,9

$$\bar{\phi} = 100,9$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 100,9333
Standardabweichung	S = 1,0654
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s = 0,2511
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm 1,05\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	S _v = $\pm 0,24\%$

bis-DNP-Cadaverin: 8 mg Cadaverin · 2HCl/10,0 ml 0,01 N HCl

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
20	0,192	0,0003986	99,65
20	0,190	0,0003944	98,6
20	0,189	0,0003824	98,1
40	0,385	0,0003996	99,9
40	0,384	0,0003986	99,65
40	0,380	0,0003944	98,6
20	0,198	0,0004110	102,75
20	0,192	0,0003986	99,65
20	0,189	0,0003924	98,1

$$\bar{\varnothing} = 99,44$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 99,4444
Standardabweichung	S = 1,4310
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s = 0,3372
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm 1,43\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	S _v = $\pm 0,33\%$

bis-DNP-Histamin: 16 mg Histamin · 2HCl/10,0 ml 0,01 N HCl

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
20	0,200	0,0006735	84,2
20	0,202	0,0006802	85,0
20	0,196	0,0006600	82,5
20	0,205	0,0006903	86,3
20	0,205	0,0006903	86,3
20	0,195	0,0006567	82,1
20	0,200	0,0006735	84,2
20	0,195	0,0006567	82,1
20	0,200	0,0006735	84,2

$$\bar{\phi} = 84,1$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 84,1000
Standardabweichung	S = 1,6232
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s = 0,3825
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm 1,93\%$
Schätzwert des mittleren Fehlers des	S _v = $\pm 0,45\%$
Variabilitätskoeffizienten	

tri-DNP-Dopamin: 16 mg Dopamin HCl/10,0 ml 0,01 N HCl

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
20	0,210	0,0005766	72,1
20	0,203	0,0005574	69,7
20	0,206	0,0005656	70,7
20	0,206	0,0005656	70,7
20	0,200	0,0005492	68,65
20	0,201	0,0005519	69,0
20	0,203	0,0005574	69,7
20	0,210	0,0005766	72,1
20	0,205	0,0005629	70,4

$$\bar{\phi} = 70,34$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 70,3388
Standardabweichung	S = 1,2268
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s = 0,2891
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm 1,74\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	S _v = $\pm 0,41\%$

tri-DNP-Noradrenalin: 16 mg Noradrenalin HCl/10 ml 0,01 N HCl

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
20	0,178	0,0005673	70,1
20	0,180	0,0005673	70,9
20	0,185	0,0005830	72,9
20	0,180	0,0005672	70,9
20	0,183	0,0005768	72,1
20	0,181	0,0005705	71,3
20	0,180	0,0005672	70,9
20	0,178	0,0005610	70,1
20	0,175	0,0005515	68,9

$$\bar{\phi} = 70,9$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 70,900
Standardabweichung	S = 1,1661
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s = 0,2748
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm 1,64\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	S _v = $\pm 0,38\%$

DNP-Tryptamin: 16 mg Tryptaminhydrochlorid/10 ml 0,01 N HCl

μl	E	g/0,5 ml	% der eingesetzten Menge
40	0,256	0,0008071	100,9
40	0,250	0,0007881	98,5
40	0,250	0,0007881	98,5
20	0,129	0,0008134	101,7
20	0,130	0,0008197	102,5
20	0,125	0,0007881	98,5
40	0,251	0,0007913	98,9
40	0,253	0,0007976	99,7
40	0,250	0,0007881	98,5

$$\bar{\varnothing} = 99,7$$

Fehlerrechnung:

Mittelwert	M = 99,7444
Standardabweichung	S = 1,5708
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	S _s = 0,3702
Variabilitätskoeffizient	V = $\pm 1,57\%$
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	S _v = $\pm 0,37\%$

7.5.6. Umrechnungsformeln für DNP-Amine (Auftragemenge 20 µl)

1. DNP-Aethanolamin

Extinktion : $1,73 \cdot 97,55 : 227,18 \cdot 0,009755$

2. DNP-Tryptamin

Extinktion : $1,88 \cdot 196,68 : 326,32 \cdot 0,019668$

3. DNP-Serotonin

Extinktion : $1,76 \cdot 212,68 : 324,39 \cdot 0,021268$

4. bis-DNP-Putrescin

Extinktion : $3,40 \cdot 161,08 : 420,35 \cdot 0,016108 \cdot 100 : 85$

5. bis-DNP-Cadaverin

Extinktion : $3,40 \cdot 175,11 : 434,38 \cdot 0,017511 \cdot 100 : 85$

6. bis-DNP-Histamin

Extinktion : $2,27 \cdot 184,10 : 443,35 \cdot 0,01841 \cdot 100 : 85$

7. bis-DNP-Tyramin

Extinktion : $2,01 \cdot 173,64 : 469,38 \cdot 0,017364 \cdot 100 : 85$

8. tri-DNP-Dopamin

Extinktion : $2,01 \cdot 189,64 : 651,55 \cdot 0,018964 \cdot 100 : 70$

9. tri-DNP-Noradrenalin

Extinktion : $2,01 \cdot 205,64 : 667,48 \cdot 0,020564 \cdot 100 : 70$

7.6. Bestimmungen aus dem Pflanzenmaterial

7.6.1. Extraktion der biogenen Amine

0,5 bis 2,0 Gramm getrocknete, gemahlene oder gefriergetrocknete Droge werden in ein 200 ml Becherglas gewogen und 3mal 20 Minuten lang mit je 50 ml 0,01 N HCl auf dem Dampfbad quantitativ extrahiert. Das Gefäß wird mit einem Uhrglas abgedeckt.

Nach dem Abkühlen werden die Extrakte 20 Minuten bei 4500 U/Min. zentrifugiert. Die überstehenden, klaren Aminextrakte werden dekantiert, mit Hilfe eines Porzellantrichters und einer Saugflasche durch ein Papierfilter genutscht und in einem 1000 ml Schliffkolben vereinigt. Mit reichlich destilliertem Wasser werden Filter und Saugflasche nachgespült.

Die vereinigten Extrakte werden mit 2,5 ml Alkalipuffer versetzt und damit auf einen pH von 6 gebracht. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer bei 45°C auf 30 bis 50 ml eingeengt und dann auf eine Spezialsäule aufgetragen.

7.6.1.1. Alkalipuffer

Der Alkalipuffer setzt sich aus einem Gemisch aus gleichen Teilen 5%iger NaCl- und 5%iger Na_2CO_3 -Lösung in destilliertem Wasser zusammen.

7.6.1.2. Spezialsäule

Die Säule besteht aus einer Glasfritte mit der Porengröße G 4, die einen Durchmesser von 2 cm hat und mindestens 15 cm lang ist. Sie wird auf eine Saugflasche gesetzt und bei leichtem Unterdruck mit einer Suspension eines speziell zubereiteten Polyamids etwa 1 1/2 cm hoch gefüllt. Auf die feste Polyamidschicht gießt man mittels eines Glasstabes vorsichtig Sephadex LH 20 Gel, das man, ebenso wie das Polyamid, mindestens 24 Stunden in Alkohol : H_2O = 1 : 2 hat quellen lassen. Die Sephadex-Schicht sollte je nach eingesetzter Drogenmenge zwischen 6 und 10 cm hoch sein.

Die Säule wird mit etwa 30 ml einer Mischung aus Alkohol : H_2O : 0,01 N HCl = 1 : 1 : 1 gespült, bevor der Pflanzenextrakt aufgetragen wird.

Dieser wird mit einer Tropfgeschwindigkeit von 80 Tropfen pro Minute durch die Säule gesaugt und mit 90 ml Alkohol : H_2O : 0,01 N HCl = 1 : 1 : 1 nachgewaschen. Das Eluat hat dann einen pH von etwa 6,5. Es wird in einen 500 ml Schliffkolben gefüllt. Die Saugflasche wird mit destilliertem Wasser sorgfältig gespült und dieses zum Eluat hinzugegeben. Dann wird die Lösung bei 45°C am Rotationsverdampfer bis auf 10 ml eingeengt.

7.6.1.3. Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

Zur Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol wird der auf 10 ml eingeengte Pflanzenextrakt mit 20 ml destilliertem Wasser und 10 ml Alkohol in einen 100 ml Schliffkolben gespült. In diesem Kolben wird die Lösung bis fast zur Trockene einrotiert. Man ergänzt mit etwa 0,7 ml 0,01 N HCl zu 1 ml. Dazu pipettiert man 2 ml der acetonischen DNFB-Lösung

und 1 ml NaHCO_3 -Puffer und setzt die Amine um, wie unter 6.5.2. beschrieben. Von dem Glycin- NaHCO_3 -Puffer werden 0,4 ml zugegeben.

Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung mit Aceton : Aether = 2 : 3 in ein 10 ml Zentrifugenglas gespült und nach 6.5.3. extrahiert.

7.6.1.4. Präparative, quantitative DC

Sie wird wie unter 6.5.4. beschrieben durchgeführt.

7.6.1.5. Herstellung des Polyamidpulvers für die Säulenchromatographie¹²⁷⁾

In eine Mischung aus 400 ml Wasser und 775 ml conc. HCl werden in einem Weithalskolben unter Rühren 400,0 Ultramid K 228 BM 2-BASF eingetragen. Nach 2 Stunden entsteht eine gelbe, viskose, klümpchenfreie Lösung, der man unter starkem Rühren 375 ml Wasser zutropfen lässt. Die Probe lässt man über Nacht stehen. Nach Zugabe von 400 ml Methanol rührt man nochmals kräftig 10 Minuten lang und lässt dann aus einem Scheidetrichter in feinem Strahl und unter Rühren mit dem "Ultra Turrax"-Dispergiergerät (Firma Janke und Kunkel, Staufen) 1850 ml Wasser zufließen, wodurch die hochpolymeren Anteile ausgefällt werden. Die Suspension wird in einem Büchner-Trichter ($\varnothing$ 24 cm) filtriert und mit destilliertem Wasser solange nachgewaschen, bis der pH-Wert 6 erreicht ist. Anschließend wird das Pulver bei 70 bis 80°C im Vakuum-Trockenschrank getrocknet und mit Trockeneis in einer Mörsermühle der Firma Retsch, Haan, gemahlen. Das Pulver wird noch durch ein Sieb mit 10000 Maschen pro Quadratcentimeter gesiebt (Korngröße 20 - 60 μ).

7.6.2. Extraktion aus Frischpflanzen

Das Frischpflanzenmaterial wird mit 50 ml 0,01 N HCl im Omnimixer zerkleinert und der entstandene Pflanzenbrei auf dem Dampfbad 3mal mit je 50 bis 100 ml Wasser jeweils 20 Minuten extrahiert. Die Extrakte werden bei 4500 U/Min. zentrifugiert, filtriert und in einer Leybold-Gefriertrocknungsanlage (G 07) lyophilisiert.

1,0 bis 2,0 Gramm des Lyophilisats werden in 100 ml 0,01 N HCl über Wasserdampf gelöst, abgekühlt, mit Alkalipuffer auf pH 6 bis 6,5 gebracht und wie ein Drogenextrakt weiterbehandelt.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) M. GUGGENHEIM, "Die biogenen Amine", S. Karger Verlag, Basel, 4. Auflage (1951)
- 2) WINTERSTEIN-TRIER, "Die Alkaloide, eine Monographie der natürlichen Basen", Gebr. Bornträger Verlag, Berlin, 960 (1931)
- 3) GAUTIER, C. r. Acad. Sci., 94, 1119 (1882)
- 4) GAUTIER, Bull. Soc. Chim. France 35, 3 (1906)
- 5) BRIEGER, "Über Ptomaine", August Hirschwald, Berlin, I, II, III (1885/1886)
- 6) M. LUCKNER, "Der Sekundärstoffwechsel in Pflanze und Tier", Fischer Verlag, Stuttgart (1969)
- 7) T. HARTMANN, D. DÖNGES, M. STEINER, Z. f. Pflanzenphysiologie 67, 404 (1972)
- 8) W. GROSCH und J.M. SCHWARZ, Lipids 6, 351 (1971)
- 9) C. HITCHCOCK und A.T. JAMES, Biochim. Biophys. Acta 116, 413 (1966)
- 10) F. DRAWERT, W. HEILMANN, R. EMBERGER und R. TRESSEL, Annal. Chem. 694, 200 (1966)
- 11) W. GROSCH, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 135, 75 (1967)
- 12) M. H. YN, D. K. SALUNKHE, L. E. OLSON, Phytochemistry 7, 555 (1968)
- 13) A. ASKAR, K. RUBACH und J. SCHORMÜLLER, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 1, 187 (1972)
- 14) R. NEU und U. FIEDLER, Naturwissenschaften 11, 259 (1954)
- 15) D. KORDTS, R. VOIGT und F. WEISS, Pharmazie 15, 586 (1960)
- 16) K. MAYER und G. PAUSE, Lebensm.-Wiss- u. Technol. 5, 108 (1972)
- 17) T. A. WHEATON und I. STEWART, Nature 206, 620 (1965)
- 18) RIELÄNDER, Sitzungsber. Ges. Naturw. Marburg 173 (1908)
- 19) KÜNG, Z. physiolog. Chemie 91, 241 (1914)
- 20) E. WERLE und A. RAUB, Biochem. Z. 318, 538 (1948)

- 21) T. HARTMANN, H. J. ILERT und M. STEINER, Z. Pflanzenphysiol. 68, 11 (1972)
- 22) O. J. CROCOMO und L. C. BASSO, Phytochemistry 13, 2659 (1974)
- 23) E. I. HERBST und E. E. SNELL, J. biol. Chem. 176, 989 (1948)
- 24) T. A. SMITH, Phytochemistry 14, 865 (1975)
- 25) WHITE, New Zealand J. Sci. Tech. 139, 157 (1944)
- 26) E. KIRBERGER und L. BRAUN, Biochem. biophys. Acta 49, 391 (1961)
- 27) L. E. FELLOWS und E. A. BELL, Phytochemistry 10, 2083 (1971)
- 28) S. GREENSMITH und T. D. TURNER, J. Pharm. Pharmac. 23, 229 (1971)
- 29) G. FAUGERAS, J. DEBELMAS und R. PARIS, C. R. Acad. Sc. Paris 264, 1864 (1967)
- 30) S. UDENFRIEND, W. LOVENBERG und A. SJOERDSMA, Arch. Biochem. Biophys. 85, 391 (1959)
- 31) F. HILKENBÄUMER, G. BUCHLOH und A. ZACHARIAE, Angew. Botanik 34, 104 (1960)
- 32) I. M. FOY und I. R. PARRAT, J. Pharm. Pharmacol. 23, 360 (1960)
- 33) CRAWFORD und WATANABE, J. biol. Chem. 19, 303 (1914)
- 34) OSTEMBERG, Proc. Soz. exp. Biol. Med. 12, 174 (1915)
- 35) A. ULLMANN, Biochem. Zeitschr. 128, 26 (1921)
- 36) SCHMALFUSS, BARTMEYER und BRANDES, Biochem. Zeitung 189, 229 (1927)
- 37) M. N. GRAZIANO, G. A. WIDMER und J. D. COUSSIO, Lloydia 30, 242 (1967)
- 38) M. N. GRAZIANO, G. E. FERRADO und J. D. COUSSIO, Lloydia 34, 453 (1971)
- 39) T. A. WHEATON und I. STEWART, Lloydia 33, 244 (1970)
- 40) J. L. McLAUGHLIN und G. A. PAUL, Lloydia 30, 91 (1967)
- 41) J. L. McLAUGHLIN und G. A. PAUL, Lloydia 29, 315 (1966)
- 42) J. LUNDSTRÖM und S. AGURELL, Acta Pharm. Suec. 8, 261 (1971)
- 43) J. LUNDSTRÖM, Acta Pharm. Suec. 8, 275 (1971)
- 44) J. LUNDSTRÖM, Acta Chem. Scand. 25, 3489 (1971)
- 45) J. LUNDSTRÖM und S. AGURELL, Biochem. Physiol. Alkaloid, p. 89, 4 Int. Symposium, Akademie Verlag Berlin (1972)

- 46) A.G. PAUL, *Lloydia* 36, 36 (1973)
- 47) S. GREENSMITH und T. D. TURNER, *J. Pharm. Pharmac.* 23, 229 (1971)
- 48) P. MARQUARDT, H. SCHMIDT und M. SPÄTH, *Arzneimittelforschung* 12, 1100 (1963)
- 49) K. MAYER und G. PAUSE, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* 2, 56 (1969)
- 50) W. FORTH, D. HENSCHLER und W. RUMMEL, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, B. I. Wissenschaftsverlag (1975)
- 51) G. KUSCHINSKY und H. LÜLLMANN, *Pharmakologie*, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1964)
- 52) S. UDENFRIEND, E. TITUS und H.I. WEISSBACH, *J. biol. Chem.* 216, 499 (1955)
- 53) T. P. WAALKES, A. SJOERDSMA, C. R. CREVELING, H. WEISSBACH und S. UDENFRIEND, *Science (Washington)* 127, 648 (1958)
- 54) J. H. WELSH, *Biogenic Amines as Physiological Regulators* (Blum J.J. ed.), New Jersey (1970)
- 55) W. BRANDT, M. REITER und K. SEIBEL, *Arch. Pharmacol.* 273, 283 (1972)
- 56) W. BRANDT, M. REITER und K. SEIBEL, *Arch. Pharmacol.* 273, 294 (1972)
- 57) N. P. SEN, *J. of Food Science* 34, 22 (1969)
- 58) NATTERMANN ARZNEIMITTEL, *Dokumentation Dopamin Nattermann Köln* (1975)
- 59) PARROT und NICOT, *Handbuch d. experimentellen Pharmakol.* 18, Part 1, 148, Springer, Berlin (1966)
- 60) W. BIRKMAYER, *Selecta* 1, 25 (1974)
- 61) T. A. WHEATON und I. STEWART, *Analytical Biochemistry* 12, 585 (1965)
- 62) P. VANDEKERHOFVE und H.K. HENDERICKX, *J. Chromatography* 82, 379 (1973)
- 63) B. J. LUKOW und E. A. BUCKLEY, *J. Chromatography* 15, 258 (1964)
- 64) S. ROKUSHIKA, S. FUNAKOSHI, F. MURAKAMI und H. HATANO, *J. Chromatography* 56, 137 (1971)
- 65) F. SANGER, *Biochem. J.* 39, 507 (1945)
- 66) F. McINTIRE, L.M. CLEMENTS und M. SPROULL, *Analyt. Chem.* 25, 1757 (1953)

- 67) F. MCINTIRE, F.B. WHITE und M. SPROULL, Arch. Biochem. 29, 376 (1950)
- 68) D. T. DUBIN, J. biol. Chem. 235, 783 (1960)
- 69) I. M. LOCKHART, Nature 177, 393 (1956)
- 70) H. BRÄUNINGER und K. SPANGENBERG, Pharmazie 12, 335 (1957)
- 71) M. RICHARDSON, Nature 197, No. 4864 (1963)
- 72) T. HARTMANN, Planta 65, 315 (1965)
- 73) H. I. ILERT und T. HARTMANN, J. Chromatography 71, 119 (1972)
- 74) E. STEIN v. KAMIENSKI, Planta 50, 291 (1957)
- 75) E. STEIN v. KAMIENSKI, Planta 50, 315 (1957)
- 76) N. SEILER, L. DEMISCH und H. SCHNEIDER, Angewandte Chemie 83, 53 (1971)
- 77) N. SEILER und M. WIECHMANN, J. Chromatography 28, 351 (1967)
- 78) N. SEILER, J. Chromatography 63, 97 (1971)
- 79) N. SEILER und M. WIECHMANN, Progress in Thin Layer Chromatography Vol. 1, 95 (1970)
- 80) N. SEILER und M. WIECHMANN, Z. Analyt. Chemie 220, 109 (1966)
- 81) N. SEILER und M. WIECHMANN, Experientia 21, 203 (1965)
- 82) W. MESSERSCHMIDT, GIT.-Fachz. Lab. 15, 484 (1971)
- 83) N. SEILER, T. SCHMIDT-GLENEWINKEL und H.H. SCHNEIDER, J. Chromatography 84, 95 (1973)
- 84) A. M. FELIX und M. H. JIMINEZ, J. Chromatography 89, 361 (1974)
- 85) ROCHE DIAGNOSTICA, Werksprospekt zu Fluram Roche, Juni (1973)
- 86) S. UDENFRIEND, H. WEISSBACH und C. T. CLARK, J. of Biol. Chem. 215, 337 (1955)
- 87) F. WEYGAND, Z. Anal. Chem. 205, 406 (1964)
- 88) S. MAKISUMI und H. A. SAROFF, J. Gas Chromatogr. 3, 21 (1965)
- 89) K. H. NEY und I. P. G. WIROTAMA, Z. Lebensmittel-Unters.Forsch. 146, 343 (1971)
- 90) K. H. NEY und I. P. G. WIROTAMA, Z. Lebensmittel-Unters.Forsch. 146, 337 (1971)

- 91) A. ZEMAN und I.P.G. WIROTAMA, Z. Analyt. Chem. 247, 158 (1969)
- 92) M. PAILER und W.I. HÜBSCH, Monatshefte f. Chemie 97, 99 (1966)
- 93) H.M. FALES und I.I. PISANO, Analyt. Biochemistry 3, 337 (1962)
- 94) W.J.A. VANDENHEUVEL, W.L. GARDINER und E.C. HORNING, Analyt. Chem. 36, 1550 (1964)
- 95) H.I. BIELIG und A. ASKAR, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 1, 183 (1972)
- 96) I.P. CHAYTOR, B. CRATHORNE und M.I. SAXBY, J. Chromatography 70, 141 (1972)
- 97) W.I. IRVINE und M.I. SAXBY, J. Chromatography 43, 129 (1969)
- 98) E. RÖDER und J. MERZHÄUSER, Z. Anal. Chem. 272, 34 (1974)
- 99) J. MERZHÄUSER, E. RÖDER und Ch. HESSE, Klin. Wschr. 51, 883 (1973)
- 100) P. R. YOUNG und H.M. McNAIR, J. Chromatography 119, 569 (1976)
- 101) T.L. PERRY und W.A. SCHROEDER, J. Chromatography 12, 358 (1973)
- 102) B.I. LUKOW und E.H. BUCKLEY, J. Chromatography 15, 258 (1964)
- 103) J. AWAPARA, V.E. DAVIS und O. GRAHAM, J. Chromatography 3, 11 (1960)
- 104) N. KIRSHNER und Mc C. GOODALL, J. Biol. Chem. 226, 207 (1957)
- 105) A. MICHAELSON und P.Z. COFFMANN, Analyt. Biochemistry 27, 257 (1969)
- 106) I. STEWARD, W.F. NEWHALL und G.I. EDWARDS, J. Biol. Chemistry 239, 930 (1964)
- 107) I. STEWARD und T.A. NEWTON, Science 145, 60 (1964)
- 108) S. GREENSMITH und T.D. TURNER, J. Pharm. Pharmacol. 23, 229 (1971)
- 109) R. L. VANDERVEEN, L.G. WEST und J. McLAUGHLIN, Phytochemistry 13, 866 (1974)
- 110) H. MATSUTANI und T. SHIBA, Phytochemistry 14, 1132 (1975)
- 111) E. DURAND, E.V. ELLINGTON, P.C. FENG, L.I. HAYNES, K.E. MAGNUS und N. PHILIP, J. Pharm. Pharmacol. 14, 562 (1962)

- 112) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer Verlag, Berlin
- 113) G. PAUSE und K. MAYER, Weinwissensch. 174 (1972)
- 114) W. GLOGGENGIESSER, Virchows Arch. path. Anat. Physiol. 312, 64 (1944)
- 115) P. MARQUARDT und J. WERRINGLOER, Food Cosmet. Toxicol. 3, 803 (1965)
- 116) S. BLADT, Dissertation, München (Juni 1974)
- 117) N. B. CHAPMAN und R.E. PARKER, J. chem. Soc. (London) 3301 (1951)
- 118) B. H. BOLTO, I. MILLER und V.A. WILLIAMS, J. chem. Soc. (London) 2109 (1955)
- 119) B. TRONOW, J. Russ. Physik. Chem. Ges. 58, 1278 (1926)
- 120) J.F. BUNNET und G.T. DAVIS, J. Americ. Chem. Soc. 76, 3011 (1954)
- 121) A.M. ASATOOR, J. Chromatography 4, 144 (1960)
- 122) F.X. MAYER und A. LUSZAK, Absorptionsspektralanalyse, W. de Gruyter Co., Berlin (1951)
- 123) J. FRANC, Chem. Listy 49, 872 (1955)
- 124) K. RANDERATH, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie GmbH (1962)
- 125) H.J. VAN OPSTALL, Trav. chim. Pays-Bas 52, 901 (1935)
- 126) B. LÜCKE, Ber. deutsch. chem. Ges. 56, 848 (1923)
- 127) H. P. HÖRHAMMER, Dissertation, München (Mai 1966)
- 128) C.H.W. HIRS, S. MOORE und W.H. STEIN, J. Biol. Chem. 200, 493 (1953)
- 129) P. DIESEL, Dissertation, München (Oktober 1974)
- 130) D. MUTING, Naturwissenschaften 39, 303 (1952)

LEBENS LAUF

Eberhard Römhild

Geburtstag:	5.10.1943
Geburtsort:	Berchtesgaden
Eltern:	Alfred Römhild, Apotheker Ursula Römhild, geb. Wünnenberg
1949 - 1964	Schulausbildung
Juni 1964	Reifeprüfung an der Oberrealschule Landsberg/Lech
1964 - 1966	Praktikum in der Marien-Apotheke Landsberg/Lech
September 1966	Pharmazeutisches Vorexamen
1967	Studium der allgemeinen Naturwissenschaften an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Sommer-Semester 1968 - Winter-Semester 1970/71	Studium der Pharmazie an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Januar - Mai 1971	Pharmazeutisches Staatsexamen
12.11.1971	Approbation als Apotheker
Juni - September 1972	Wehrdienst am Institut für Wehrpharmazie München
November 1972	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit

